

**VARIASI GENETIK DAN KEKERABATAN KOSAMBI (*Schleichera oleosa*  
Merr. ) DI MALANG RAYA BERDASARKAN SEKUEN MARKA  
MOLEKULER GEN *rbcL* (Large subunit ribulose 1,5 biphosphat  
carboxylase/oxygenase)**

**SKRIPSI**

**Oleh :  
FATHIMAH CAHYA RAUDHAH  
NIM 16620085**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2021**

**VARIASI GENETIK DAN KEKERABATAN KOSAMBI (*Schleichera  
oleosa* Merr.) DI MALANG RAYA BERDASARKAN SEKUEN MARKA  
MOLEKULER GEN *rbcL* (Large subunit ribulose 1,5 biphosphat  
carboxylase/oxygenase)**

**SKRIPSI**

**Oleh:  
FATHIMAH CAHYA RAUDHAH  
NIM. 16620085**

**Diajukan kepada :  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang  
Untuk Memenuhi Salah satu persyaratan dalam  
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2021**

**VARIASI GENETIK DAN KEKERABATAN KOSAMBI (*Schleichera  
oleosa* Merr.) DI MALANG RAYA BERDASARKAN SEKUEN MARKA  
MOLEKULER GEN *rbcL* (Large subunit ribulose 1,5 biphosphat  
carboxylase/oxygenase)**

**SKRIPSI**

**Oleh:  
FATHIMAH CAHYA RAUDHAH  
NIM. 16620085**


**telah diperiksa dan disetujui untuk diuji  
tanggal: 7 Juni 2021**

**Pembimbing I**



**Dr. Evika Sandi Savitri, M.P  
NIP.19741018 200312 2 002**

**Pembimbing II**



**Dr. H. Ahmad Barizi, M.A.  
NIP. 197312121998031008**



VARIASI GENETIK DAN KEKERABATAN KOSAMBI (*Schleichera oleosa*  
Merr.) DI MALANG RAYA BERDASARKAN SEKUEN MARKA  
MOLEKULER GEN *rbcL* (Large subunit ribulose 1,5 biphosphat  
carboxylase/oxygenase)

SKRIPSI

Oleh :  
FATHIMAH CAHYA RAUDHAH  
NIM. 16620085

telah dipertahankan  
di Depan Dewan Penguji Skripsi dan dinyatakan diterima sebagai salah satu  
persyaratan untuk memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)  
Tanggal : 22 Juni 2021

Ketua Penguji : Suyono, M.P.  
NIP. 19710622 200312 1 002  
Anggota Penguji 1 : Didik Wahyudi, M.Si.  
NIP. 19860102 201801 1 001  
Anggota Penguji 2 : Dr. Evika Sandi Savitri, M.P.  
NIP. 19741018 200312 2 002  
Anggota Penguji 3 : Dr. H. Ahmad Barizi, M.A.  
NIP. 19731212 199803 1 008

(.....)  
(.....)  
(.....)  
(.....)

Mengetahui

Ketua Program Studi Biologi



Dr. Evika Sandi Savitri, M.P.  
NIP. 19741018200312 2 002

## **HALAMAN PERSEMBAHAN**

Alhamdulillahirobbil'alamin, segala puji syukur kepada Allah SWT atas limpahan rahmat, rezeki, taufik serta hidayah-Nya, sehingga saya bisa lancar menuntut ilmu hingga dapat menyelesaikan tugas akhir (skripsi) untuk mendapatkan gelar Sarjana Sains (S.Si) di program studi Biologi. Pertama-tama saya mengucapkan banyak terimakasih kepada keluarga, terkhusus orang tua saya tercinta yakni Bapak H. Chaeruddin dan Ibu Ria yang senantiasa mensupport dan memfasilitasi dari segala aspek serta mendo'akan saya sehingga saya mampu menyelesaikan studi dengan lancar dan baik. Tak lupa ucapan terimakasih untuk dosen pembimbing tim Kosambi, Ibu Azizatur Rahmah M.Sc serta teman tim Kosambi yakni; Nadya, Zahra dan Lail. Tanpa bantuan, support dan semangat dari tim Kosambi saya tidak mampu menyelesaikan tugas akhir ini dengan baik. Terimakasih juga kepada teman-teman Biologi C'16, yang selalu kompak dan saling menghibur sehingga masa perkuliahan jadi menyenangkan. Semoga Allah SWT selalu memberikan kesehatan, rizki yang melimpah serta umur panjang kepada mereka semua. Aamiin ya rabbal a'lamin.

## PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Fathimah Cahya Raudhah

NIM : 16620085

Jurusan : Biologi

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Skripsi : Variasi Genetik dan Kekerabatan Kosambi (*Schleichera oleosa* Merr.) di Malang Raya Berdasarkan Sekuen Marka Molekuler Gen *rbcL* (Large subunit ribulose 1,5 biphosphat carboxylase/oxygenase).

menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-banar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi akademik maupun hukum atas perbuatan tersebut.

Malang, 27 Juni 2021  
Yang membuat pernyataan,



Fathimah Cahya Raudha  
NIM. 16620085

## **HALAMAN PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI**

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

**Variasi Genetik dan Keekerabatan Kosambi (*Schleichera oleosa* Merr.) di Malang Raya Berdasarkan Sekuen Marka Molekuler Gen *rbcL* (Large subunit ribulose 1,5 biphosphat carboxylase/oxygenase).**

Fathimah Cahya Raudhah, Evika Sandi Savitri, Ahmad Barizi

Program Studi Biologi. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

**ABSTRAK**

Kosambi (*Schleichera oleosa*) merupakan salah satu tanaman yang adaptif terhadap perubahan lingkungan (Suita, 2012), selain itu tanaman tersebut dapat dijadikan sebagai tanaman obat. Analisis hubungan kekerabatan merupakan langkah dasar yang bertujuan untuk mempermudah dalam pemanfaatan tanaman lebih lanjut seperti pemanfaatan dalam potensi obat sekaligus dalam rangka konservasi terhadap spesies tersebut. Penelitian terkait analisis hubungan kekerabatan *S. oleosa* di Malang Raya secara teknik analisis molekuler belum banyak dilakukan, sehingga informasi biomolekuler mengenai *S. oleosa* tergolong sedikit (jarang). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis hubungan kekerabatan *S. oleosa* berdasarkan marka sekuen *rbcL*. *RbcL* merupakan gen pengkode sintesis enzim rubisco yang bersifat konservatif dan stabil, mudah untuk diisolasi dan dianalisis, serta memiliki tingkat keberhasilan sekuen yang cukup tinggi. Penelitian ini dilakukan secara deskriptif kualitatif dan eksploratif. Penelitian ini menggunakan sampel daun *S. oleosa* dari berbagai lokasi dengan ketinggian yang berbeda di wilayah Malang Raya. DNA sampel tersebut diekstraksi, kemudian dilakukan proses amplifikasi gen *rbcL* dan selanjutnya dilakukan proses sekuensing. Berdasarkan analisis sekuen yang diperoleh, dapat dibuat rekonstruksi pohon filogenetik dengan metode *Neighbor-Joining* menggunakan aplikasi *Geneious* v 2021.1.1. Analisis variasi sekuen gen *rbcL* menggunakan aplikasi *DNAsp* 6. Analisis tersebut dilakukan untuk mengetahui letak polimorfisme seperti SNP pada sekuen. Berdasarkan analisis variasi ditemukan terdapat 12 variasi pada sekuen gen *rbcL* *S. oleosa*. Berdasarkan rekonstruksi pohon filogenetik dapat diketahui bahwa ke-6 sampel *S. oleosa* berkerabat sangat dekat. Diduga sampel (BL dan TR) berasal dari indukan yang sama begitu pula dengan sampel (TD, GL, VT dan SK).

Kata kunci: Kosambi (*Schleichera oleosa* Merr.), Variasi genetik, Filogenetik, Marka molekuler gen *rbcL*.



**Genetic Variation and Kinship of Kosambi (*Schleichera oleosa* Merr.) in  
Malang Raya Based on the Molecular Marker Sequence of the *rbcL* Gene  
(Large subunit ribulose 1,5 biphosphat carboxylase/oxygenase).**

Fathimah Cahya Raudhah, Evika Sandi Savitri, Ahmad Barizi

Program Studi Biologi. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri  
Maulana Malik Ibrahim Malang.

**ABSTRACT**

Kosambi (*Schleichera oleosa*) is one of the plants that adapt to environmental changes (Suita, 2012), besides that, this plant can be used as a medicinal plant. Analysis of the kinship relationships is a basic step that aims to facilitate the further use of plants such as utilization in medicinal potency as well as in the context of conservation of these species. Research related to the analysis kinship of *S. oleosa* in Malang Raya with molecular analysis techniques has not been carried out, so the biomolecular information about *S. oleosa* is relatively few (rare). The purpose of this research is to analyze the genetic variation and the kinship of *S. oleosa* based on *rbcL* sequence markers. *RbcL* is a gene coding for the synthesis of the rubisco enzyme which is conservative and stable, easy to isolate and analyze, and has a fairly high success rate of sequence. *RbcL* is a gene coding for the synthesis of the rubisco enzyme which is conservative and stable, easy to isolate and analyze, and has a fairly high success rate of sequence. This research was conducted in a qualitative and exploratory descriptive manner. This research used samples of *S. oleosa* leaves from various locations with different altitude in the Greater Malang area. The sample DNA was extracted, then the *rbcL* gene amplification process was carried out and then the sequencing process was carried out. Based on the sequence analysis obtained, a phylogenetic tree reconstruction can be made using the *Neighbor-Joining* method using the Geneious v 2021.1.1 application. Analysis of the variation of the *rbcL* gene sequence using the DNAsp 6 application. The analysis was carried out to determine the location of polymorphisms such as SNPs in the sequence. Based on the analysis of variation, there were 12 variations in the *rbcL* gene sequence of *S. oleosa*. Based on the reconstruction of the phylogenetic tree, it can be seen that the 6 samples of *S. oleosa* are very closely related. It is suspected that the samples (BL and TR) came from the same parent as well as the samples (TD, GL, VT and SK).

**Keywords:** Kosambi (*Schleichera oleosa* Merr.), Genetic variation, Phylogenetics, Molecular markers of the *rbcL* gene.

## مستخلص البحث

تحليل علاقة قرابة كوسامبي (*Schleichera oleosa* Merr.) في مالانج الكبرى استنادا إلى تسلسل العلامات الجزيئية للجين *rbcL* (الوحدة الفرعية 1.5 (biphosphat carboxylase/oxygenase). فاطمة جهيا روضة، أفريكا سندي سفتري، أحمد بارزي قسم دراسة علم الأحياء. كلية العلوم والتكنولوجيا. الجامعة الإسلامية الحكومية مولانا ملك إبراهيم مالانج.

الكلمة المفتاحية : كوسامبي (*Schleichera oleosa* Merr.) ، النشوء والتطور، العلامات الجزيئية للجين *rbcL*، تعدد الأشكال.

كوسمبي (*Schleichera oleosa*) إحدى من نبات الذي قابل للتكيف مع الغيبرات البيئية (Suita, 2012) ومع ذلك كان ذلك النبات قابل لاستخدامه كنبات طبي. يعد تحليل علاقة القرابة هي خطوة أساسية تهدف إلى تسهيل الاستخدام الإضافي للنباتات مثل استخدام القدرات الطبية وكذلك في سياق الحفاظ على هذه الأنواع. لم يتم البحث عن تحليل علاقة قرابة *S. oleosa* في مالانج الكبرى باستخدام تقنيات التحليل الجزيئي، لذا فإن المعلومات الجزيئية الحيوية حول *S. oleosa* صغيرة نسبياً (نادرة). ويهدف من هذا البحث لتحليل علاقة قرابة *S. oleosa* استنادا على علامات تسلسل *rbcL*. *RbcL* هو جين يقوم بترميز تخليق إنزيم روبيكو وهو محافظ ومستقر، ويسهل عزله وتحليله، وله معدل نجاح عالٍ إلى حد ما في التسلسل. تم إجراء هذا البحث بطريقة وصفية استكشافية نوعية. استخدمت هذه الدراسة عينات من أوراق كوسامبي (*Schleichera oleosa*) من مواقع مختلفة بارتفاعات مختلفة في منطقة مالانج الكبرى. تم استخلاص عينة الحمض النووي، ثم تم إجراء عملية تضخيم الجين *rbcL* ثم تم تنفيذ عملية التسلسل. بناءً على تحليل التسلسل الذي تم الحصول عليه، يمكن إجراء إعادة بناء شجرة النشوء والتطور باستخدام طريقة الجار-الانضمام باستخدام تطبيق Geneious v 2021.1.1. تحليل تباين تسلسل الجينات *rbcL* باستخدام تطبيق DNAsp 6. تحليل التباين في تسلسل الجين *rbcL* باستخدام تطبيق DNAsp 6. تم إجراء التحليل لتحديد موقع تعدد الأشكال مثل SNP في التسلسل. بناءً على إعادة بناء شجرة النشوء والتطور، يمكن ملاحظة أن هناك مجموعتين تشكلت، وهما المجموعة الأولى (*S. oleosa* (BL dan TR) والمجموعة الثانية (*S. oleosa* (TD, GL, VT, dan SK) ومجموعة خارجية عينات من *S. oleosa* من الهند. الاختلاف في آخر 10 قواعد من تسلسل الجينات *rbcL* (أزواج النطاق الأساسي 580-590) هذا هو الأساس لمعرفة أن *S. oleosa* في مالانج الكبرى لها سلالتان مختلفتان بحيث تكون هناك مجموعتان تتشكلان في إعادة بناء شجرة النشوء والتطور. أظهرت نتائج تحليل التباين في التسلسل الجيني *rbcL* لـ *S. oleosa* في مالانج و *S. oleosa* من الهند أن هناك مواقع محددة في هذه الأنواع.

## KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Bismillahirrahmaanirrahiim, segala puji bagi Allah Tuhan semesta alam karena atas berkat dan rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini yang berjudul **“Variasi Genetik dan Kekerabatan Kosambi (*Schleichera oleosa* Merr.) di Malang Raya Berdasarkan Sekuen Marka Molekuler Gen *rbcL* (Large subunit ribulose 1,5 biphospat carboxylase/oxygenase)”**. Tidak lupa pula shalawat serta salam disampaikan kepada junjungan Nabi besar Muhammad SAW. Berkat bimbingan dan dorongan dari berbagai pihak maka penulis mengucapkan terima kasih yang tak terkira khususnya kepada:

1. Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Hariani, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Dr. Evika Sandi Savitri, M.P. selaku Ketua Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, sekaligus selaku Dosen wali yang telah membimbing dan memberikan masukan sehingga penulis dapat menyelesaikan studi dengan baik.
4. Dr. Evika Sandi Savitri, M.P., Azizatur Rahmah, M.Sc. dan Dr. H. Ahmad Barizi, M.A. selaku pembimbing I dan II, yang telah membimbing penulis dengan penuh kesabaran dan keikhlasan dalam meluangkan waktu untuk membimbing penulis sehingga tugas akhir ini dapat terselesaikan.
- 5..Seluruh dosen dan laboran di Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang setia mendampingi penulis dalam melakukan penelitian di laboratorium tersebut.

Semoga amal baik yang telah diberikan kepada penulis mendapat balasan dari Allah SWT. Skripsi ini sudah ditulis secara cermat dan sebaik-baiknya, namun apabila ada kekurangan, saran dan kritik yang membangun sangat penulis harapkan.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb

**Malang, 7 Juni 2021**

**Penulis**

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERSETUJUAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN.....	v
HALAMAN PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI.....	vi
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
مختلص البحث.....	ix
KATA PENGANTAR.....	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
DAFTAR SINGKATAN.....	xvi
 <b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	 1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	7
1.3 Tujuan Penelitian .....	8
1.4 Manfaat Penelitian .....	8
1.5 Batasan Masalah .....	8
 <b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	 10
2.1 Botani Kosambi ( <i>Schleichera oleosa</i> ).....	10
2.1.1 Morfologi <i>S. oleosa</i> .....	10
2.1.2 Klasifikasi <i>S. oleosa</i> .....	15
2.1.3 Habitat <i>S. oleosa</i> .....	12
2.1.4 Distribusi <i>S. oleosa</i> .....	12
2.1.5 Pemanfaatan <i>S. oleosa</i> .....	15
2.2 Variasi Genetik .....	16
2.3 Rekonstruksi Filogenetik .....	17
2.3.1 Maximum Parsimony.....	20
2.3.2 Distance.....	20
2.3.3 <i>Neighbor-Joining</i> .....	21
2.4 Gen Kloroplas .....	21
2.4.1 matK.....	21
2.4.2 trnL-F.....	22
2.4.3 rbcL.....	22

<b>BAB III METODE PENELITIAN .....</b>	<b>25</b>
3.1 Waktu dan Tempat .....	25
3.2 Rancangan Penelitian .....	25
3.3 Alat dan Bahan .....	25
3.4 Langkah Kerja .....	26
3.4.1 Pengambilan Sampel .....	26
3.4.2 Isolasi DNA Tanaman .....	27
3.4.3 Uji Kuantitatif dan Kualitatif Sampel .....	28
3.4.3.1 Uji Kuantitatif .....	28
3.4.3.2 Uji Kualitatif .....	28
3.5 Amplifikasi dan Sekuensing Sampel .....	29
3.6 Analisis Data Sampel .....	30
3.6.1 Analisis Data Sekuen .....	30
3.6.2 Analisis Filogenetik .....	30
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>31</b>
4.1 Analisis variasi genetik <i>S. oleosa</i> di Malang Raya berdasarkan marka gen <i>rbcL</i> .....	31
4.2 Hubungan kekerabatan <i>S. oleosa</i> di Malang Raya sekuen marka gen <i>rbcL</i> .....	35
<b>BAB V PENUTUP .....</b>	<b>41</b>
5.1 Kesimpulan .....	41
5.2 Saran .....	41
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>42</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>46</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
3.4.1.1 Titik Koordinat dan Ketinggian Tempat Sampel.....	26
4.1.1 Variasi Genetik .....	31

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1.1.1 Morfologi <i>S. oleosa</i> .....	11
2.1.1.2. Peta persebaran <i>S. oleosa</i> .....	12
2.3.1 cpDNA (Gen Kloroplas).....	18
4.2.1 Rekonstruksi Pohon Filogenetik <i>S. oleosa</i> berdasarkan sekuen rbcL dengan Metode <i>Neighbor-Joining</i> .....	34

## DAFTAR LAMPIRAN

1. Visualisasi Uji Kualitatif.....	46
2. Hasil Uji Kuantitatif.....	46
3. Visualisasi amplifikasi gen rbcL <i>S. oleosa</i> .....	47
4. Hasil sekuen gen rbcL sampel <i>S. oleosa</i> .....	48
5. Diagram analisis QV 20+ sekuen gen rbcL sampel <i>S. oleosa</i> .....	49



## DAFTAR SINGKATAN

<b>Simbol/Singkat</b>	<b>Keterangan</b>
CO <sub>2</sub>	Carbon dioxide
O <sub>2</sub>	Oxygen
ddH <sub>2</sub> O	Aquabidestilata
M	Molar
μl	Mikroliter
°C	derajat Celcius
rpm	Rotation per minute
CTAB	Cetyltri methyl ammonium Bromide
NaCl	Natrium clorida
CI	Cloroform isopropanol
TE	Tris-EDTA
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
A	Absorbansi
EtBr	Ethidium bromide
PCR	Polymerase Chain Reaction
bp	base pare
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
matK	Maturase K
ITS	Internal Transcribed Spacer
rbcL	Large subunit ribulose 1,5 biphospat carboxylase/oxygenase

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Kosambi (*Schleichera oleosa*) merupakan salah satu tanaman yang adaptif terhadap perubahan lingkungan (Suita, 2012), karena mampu tumbuh pada ketinggian yang berbeda. *S. oleosa* dapat ditemukan tumbuh liar di habitat seperti savana, hutan tropik, dan hutan-hutan jati. *S. oleosa* sering digunakan sebagai tanaman pengisi pada tanaman jati, karena jenis ini memiliki perakaran yang dalam dan selalu tumbuh hijau sehingga tidak mengganggu pertumbuhan tanaman pokok sekaligus berfungsi sebagai sekat bakar. (Heyne, 1987). Sifat adaptif yang dimiliki *S. oleosa* disebabkan beberapa faktor salah satunya memiliki daya serap karbon tinggi sehingga cadangan CO<sub>2</sub> yang dimiliki cukup tinggi (Aulia, 2019).

Tanaman *S. oleosa* (*Schleicera oleosa*) memiliki manfaat di setiap organnya. Manfaat *S. oleosa* berguna dalam pemenuhan kebutuhan seperti batang *S. oleosa* sering digunakan sebagai bahan kayu bakar dan bahan dasar perahu. Kulit batang *S. oleosa* juga dapat dimanfaatkan sebagai bahan dasar kosmetik (Zat Astringent) (Meshram et al., 2015). Dalam bidang kesehatan kulit batang *S. oleosa* sering digunakan untuk meredakan demam dan pembengkakan kelenjar getah bening. Selain itu, getah kulit batang *S. oleosa* juga dapat mengobati penyakit diare, malaria dan disentri (Goswami and Singh, 2017). Daun *S. oleosa* bermanfaat dalam mengobati penyakit kulit seperti eksim, sedangkan dalam bidang industri daun *S. oleosa* dapat dijadikan sebagai pakan ternak (Meshram et al., 2015).

Organ tanaman *S. oleosa* yang paling banyak dimanfaatkan dan oleh masyarakat yakni penggunaan minyak dari biji sebagai obat herbal dan

*Artinya: 24. Maka hendaklah manusia itu memperhatikan makanannya, 25. Sesungguhnya Kami benar-benar telah mencurahkan air (dari langit), 26. Kemudian Kami belah bumi dengan sebaik-baiknya, 27. Lalu Kami tumbuhkan biji-bijian di bumi itu, 28. Anggur dan sayur-sayuran, 29. Zaitun dan kurma, 30. Kebun-kebun (yang) lebat, 31. dan buah-buahan serta rumput-rumputan, 32. Untuk kesenanganmu dan untuk binatang-binatang ternakmu (QS. Abasa [80]: 24-32).*

Berdasarkan ayat tersebut dapat diketahui bahwa Allah memerintahkan kita sebagai manusia untuk memperhatikan apa yang kita konsumsi (makanan). Salah satu dari sumber makanan tersebut adalah tanaman yang Allah tumbuhkan dari dalam tanah (bumi) kemudian Allah turunkan hujan (air) sehingga tanaman tersebut tumbuh subur. Tanaman tersebut tumbuh dari biji, bibit, kemudian muncul bagian-bagian tanaman yang dapat dikonsumsi. Adapun daunnya dari rerumputan dijadikan sayur-sayuran kemudian ada anggur serta kurma yang dapat dikonsumsi

buahnya. Tanaman-tanaman tersebut ditumbuhkan oleh Allah agar memberikan kita rasa senang dan membawa manfaat yang banyak untuk tubuh.

Menurut tafsir *Ibnu Katsir* mengenai surat Q.S Abasa [80]: 26 yakni; Kami tempatkan air itu dalam bumi dan masuk melalui celah-celahnya, kemudian meresap ke dalam biji-bijian yang telah disimpan di dalam tanah. Maka tumbuhlah biji-bijian itu menjadi tetumbuhan yang muncul di permukaan bumi, lalu meninggi. Kemudian pada ayat 27-28 terdapat kata *Al-habb* artinya biji-bijian, *al-inab* artinya anggur. *Al-qadb* artinya sejenis sayuran yang dimakan oleh ternak dengan mentah-mentah. Adapun manfaat dari buah zaitun dan kurma menurut tafsir *ibnu katsir* yakni buah zaitun cukup dikenal dan dapat dijadikan sebagai lauk, begitu pula minyaknya. Bahkan minyaknya dapat digunakan untuk meminyaki tubuh dan juga sebagai bahan bakar penerangan. Buah kurma dapat dimakan dalam keadaan gemading, ataupun sudah masak; dapat pula dijadikan sale, dan perasannya dapat dibuat minuman dan cuka.

Selain pemanfaatannya sebagai herbal alami pohon *S. oleosa* merupakan salah satu pohon penghijauan kota karena dapat mengurangi polusi karbondioksida. *S. oleosa* memiliki kanopi yang cukup lebar sehingga dapat memberikan asupan O<sub>2</sub> yang tinggi. *S. oleosa* yang tergolong kedalam famili sapindaceae ini adaptif tumbuh pada ketinggian rendah hingga sedang yakni 100-650 mdpl. Pada ketinggian tersebut kelembapan cenderung rendah dan suhu cukup hangat sehingga *S. oleosa* memiliki kemampuan dalam menyerap CO<sub>2</sub> tinggi (Suita, 2012; Sanusi, 2018).

*S. oleosa* tumbuh tersebar di wilayah lembah Himalaya, Srilangka hingga wilayah Asia Tenggara seperti Malaysia dan Indonesia. *S. oleosa* di Indonesia,

tumbuh baik di daerah Jawa, Bali, Nusa Tenggara, Sulawesi, Maluku, Pulau Seram dan Pulau Kai. Di Jawa Timur dapat ditemukan di Panarukan, Probolinggo, Pasuruan dan Besuki. (Heyne, 1987). *S. oleosa* digunakan sebagai tanaman penghijauan pada beberapa daerah di Jawa, seperti di Tuban, Desa Karanganyar, Purwodadi, Grobogan. Pohon kesambi dapat pula ditemukan di Suaka Margasatwa Pulau Rambut, Taman Nasional Baluran, Cagar Alam Pulau Sangiang di Kabupaten Bima Provinsi NTB, dan di Taman Nasional Bali Barat.

*S. oleosa* biasanya ditanam pada daerah pantai dengan ketinggian 250 mdpl yang beriklim kering hingga ketinggian 600 mdpl yang beriklim cukup lembab. *S. oleosa* di Pulau Jawa ditemukan pada ketinggian rendah, namun dapat juga ditemukan pada ketinggian hingga (900–1200) m. *S. oleosa* membutuhkan curah hujan tahunan 750 – 2500 mm. Tumbuhan ini mampu hidup pada suhu maksimum 35–47.5°C dan suhu minimum 25°C. *S. oleosa* dapat tumbuh dengan kondisi tanah kering, hingga kondisi tanah yang berawa. Kondisi tanah habitat *S. oleosa* dapat berbatu, kerikil, liat, dan tanah yang sedikit asam. Kawasan hutan produksi yang tidak produktif dan lahan kritis di luar kawasan hutan dapat ditanami *S. oleosa* (Iwasa, 1997 dalam Agussalim, 2012).

Analisis hubungan kekerabatan merupakan hal yang penting dalam rangka mengidentifikasi suatu tanaman. Analisis hubungan kekerabatan yakni kegiatan peneliti untuk mengelompokkan (mengkarakterisasi) suatu tanaman yang berkerabat dekat berdasarkan kenampakan morfologi maupun urutan susunan DNA (sekuen DNA). Hal tersebut salah satunya bertujuan untuk mempermudah dalam pemanfaatan tanaman lebih lanjut seperti pemanfaatan dalam potensi

obat sekaligus dalam rangka konservasi terhadap spesies tersebut (Herrmann & Wink, 2014; Pourmohammad, 2014).

Menurut Herrmann & Wink (2014) menganalisis hubungan kekerabatan lebih efisien berdasarkan pengamatan pada sekuen DNA suatu tanaman. Menganalisis sekuen DNA lebih akurat dan konsisten dibandingkan dengan hanya menganalisis morfologi dan anatomi. Hal tersebut dikarenakan tidak semua basa nukleotida (gen) dapat terekspresikan/muncul pada karakter morfologi maupun anatomi (Herrmann & Wink, 2014; Hidayat & Pancoro, 2008).

DNA barcoding merupakan metode teknik analisis berdasarkan sekuen DNA tertentu untuk mengenali suatu spesies, sehingga dapat diketahui profil filogenetiknya. DNA barcoding juga merupakan metode yang mudah dan dapat diterima keabsahannya dalam mengidentifikasi suatu spesies (Wattoo *et al.*, 2016; Sunaryo, 2015). Menggunakan metode analisis DNA barcoding untuk identifikasi secara molekuler harus ditentukan terlebih dahulu sekuen DNA target sebagai marka yang akan dianalisis. Sekuen DNA yang digunakan sebagai marka atau penanda merupakan gen bersifat universal serta memiliki urutan sekuen yang khas sehingga dapat menjadi identitas spesies tersebut (Blume *et al.*, 2018).

Salah satu sekuen DNA yang dapat dijadikan marka ialah gen yang berasal dari genom kloroplas tumbuhan (cpDNA). Genom kloroplas diketahui lebih adaptif dan stabil, sehingga cocok untuk dijadikan sebagai gen marka/penanda untuk mengetahui evolusi serta filogenetik suatu spesies. Beberapa marka gen yang biasa digunakan sebagai DNA barcoding berasal dari gen kloroplas yakni; *matK*, *trnL*, *atpB* dan *rbcL*. (Chetia *et al.*, 2016). Diantara ke-4 marka yang berasal dari genom kloroplas, lokus *matK* dan *rbcL* dianggap sebagai penanda barcode DNA tanaman

standar karena universalitas, kualitas urutan keseluruhan yang relatif tinggi, biaya rendah, dan daya diskriminatif yang tinggi antara angiospermae. Marka *rbcL* memiliki keberhasilan amplifikasi PCR, dan proses sekuen yang lebih baik dibandingkan dengan marka *matK* (Moura *et al.*, 2019).

Genom *rbcL* bersifat konservatif dengan rata-rata substitusi nukleotida yang rendah sehingga tidak mengalami rekombinasi serta genom diturunkan secara uniparental (Basith, 2012). Chetia *et al.* (2016) menyatakan bahwa gen *rbcL* merupakan gen yang memiliki tingkat substitusi (mutasi) nukleotida sinonim rendah dibandingkan dengan gen pada inti sel, sehingga kemampuan untuk berevolusi menjadi lambat. Selain itu *rbcL* memiliki rantai polimorfisme panjang sebagai pembatas pada tingkatan taksonomi. Nurhasanah & Papuungan (2019); Moura *et al.* (2019) menyatakan bahwa tingkat keberhasilan analisis molekuler dalam menggunakan marka molekuler *rbcL* juga lebih besar dibandingkan marka molekuler ITS, *matK*, *trnH* dll. Analisis molekuler yang dimaksud yakni dalam melakukan teknik amplifikasi PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dan sequencing DNA. Hal tersebut dikarenakan marka *rbcL* memiliki *basepare* yang cukup panjang dan terletak pada genom kloroplas yang konservatif.

Teknik analisis molekuler merupakan metode untuk menganalisis genetik berdasarkan variasi komposisi dan fungsi gennya. Metode ini membutuhkan teknologi khusus dalam mengisolasi DNA kemudian diproses hingga sifat polimorfismenya dapat dikenali. Beberapa analisis pasca prosedur teknik analisis biologi molekuler dapat bermanfaat bagi ilmu pengetahuan, salah satunya untuk menganalisis filogeni (Sukoco dkk., 2016). Analisis alignment sekuen gen *rbcL*

dan pembuatan konstruksi pohon filogenetik *S. oleosa* yakni dengan menggunakan program aplikasi Geneious Prime 2021.

Berdasarkan informasi dari genbank NCBI penelitian terkait analisis hubungan kekerabatan *S. oleosa* sebagai tanaman monotipe secara teknik analisis molekuler belum banyak dilakukan. Terdapat sekitar 29 data nukleotida dari berbagai marka molekuler dan 23 data protein *S. oleosa*. Dari data tersebut dapat diketahui informasi biomolekuler mengenai *S. oleosa* tergolong sedikit. Maka dari itu diperlukan penelitian berbasis teknologi biomolekuler berdasarkan analisis marka sekuen *rbcL*. *RbcL* merupakan gen pengkode sintesis enzim rubisco yang bersifat stabil dan adaptif, mudah untuk diisolasi serta dianalisis. *RbcL* dibandingkan dengan marka genom kloroplas lainnya lebih mudah diisolasi dan diamplifikasi menggunakan PCR serta memiliki tingkat keberhasilan sekuen yang cukup tinggi (Herrmann & Wink, 2014; Moura *et al.*, 2019; Rafidah *et al.*, 2019). Penelitian ini bertujuan untuk memberikan informasi terkait data analisis variasi genetik serta hubungan kekerabatan *S. oleosa* berdasarkan data hasil sekuen DNA *S. oleosa* menggunakan marka *rbcL*. Informasi dari penelitian ini dapat dijadikan dasar untuk dilakukan penelitian lebih lanjut.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang terdapat pada penelitian ini adalah:

1. Bagaimana variasi genetik *S. oleosa* di Malang Raya berdasarkan marka gen *rbcL*?
2. Bagaimana hubungan kekerabatan *S. oleosa* di Malang Raya berdasarkan sekuen marka gen *rbcL*?



### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari dilakukannya penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui variasi genetik *S. oleosa* di Malang Raya berdasarkan marka gen rbcL.
2. Untuk mengetahui hubungan kekerabatan *S. oleosa* di Malang raya berdasarkan sekuen marka gen rbcL.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diambil dari penelitian ini adalah:

1. Memberikan informasi tentang hubungan kekerabatan *S. oleosa* di Malang raya berdasarkan analisis rekonstruksi pohon filogenetik sekuen marka gen rbcL, sebagai dasar untuk dilakukan penelitian lebih lanjut.
2. Memberikan informasi kepada masyarakat dasar tentang pemanfaatan dan potensi obat tanaman *S. oleosa* serta kelimpahan berdasarkan adaptasi nya pada ketinggian yang berbeda.
3. Memberikan data dukung (sumbangan informasi) pada Gen Bank NCBI, terkait sekuen rbcL *S. oleosa* di Indonesia.

### 1.5 Batasan Masalah

Batasan Masalah yang terdapat pada penelitian ini adalah:

1. Tanaman *S. oleosa* (*Schleichera oleosa*) yang digunakan sebagai sampel diperoleh dari 6 titik yakni: Wilayah Malang Selatan (300-430 mdpl) dengan 2 titik tempat sampel berbeda yakni GL (Gondanglegi), dan TR (Turen). Wilayah Malang Kota (450-530 mdpl) dengan tiga titik tempat sampel berbeda yakni VT (Lowokwaru), BL (Blimbing), SK (Sukun). Kecamatan

Lowokwaru perbatasan Dau (650 mdpl) dengan satu titik tempat sampel yakni TD (Lowokwaru).

2. Penelitian berupa analisis sekuen dari gen *rbcL* (cp-DNA) terhadap 6 sampel *S. oleosa*
3. Metode amplifikasi dilakukan berbasis PCR menggunakan primer reverse forward *rbcL Dimocarpus longan* dari famili Sapindaceae
4. Metode sekuensing menggunakan teknik metode Sanger yang dianalisis di 1<sup>st</sup> Base Malaysia.
5. Pembacaan sekuen menggunakan software Geneious Prime v 2021.1.1. Alignment sekuen dengan metode Clustal Omega dan pembuatan pohon filogenetik menggunakan metode Neighbour-Joining dengan pengulangan 1000 bootstrap.
6. Outgroup diambil dari sumber nukleotida NCBI sebanyak 3 outgroup, yakni; *Schleichera oleosa* dari India, *Dimocarpus longan*, dan *Litchi sinensis*

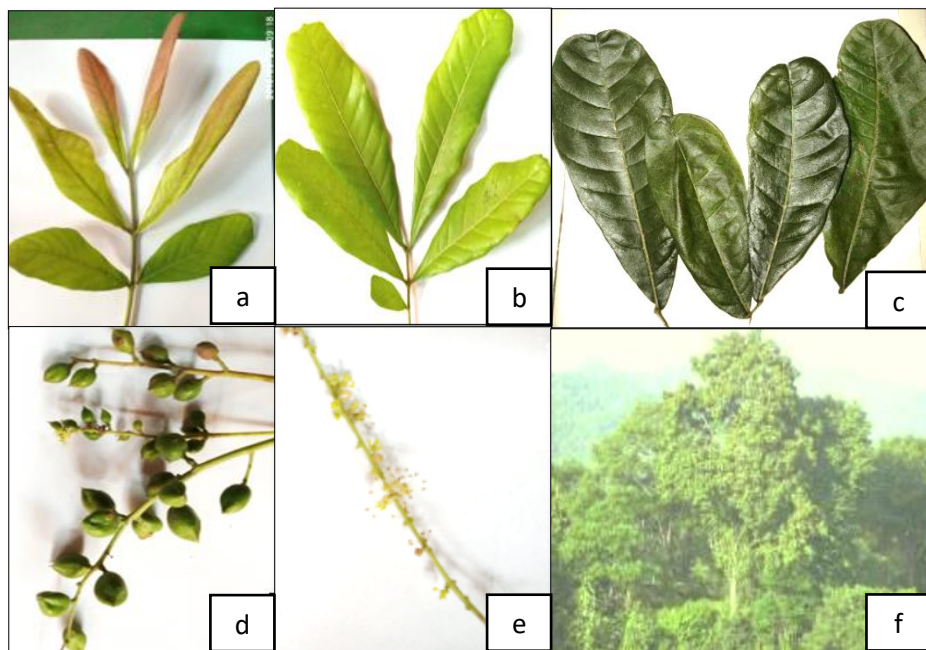
## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Botani Kosambi (*Schleichera oleosa*)

##### 2.1.1 Morfologi *S. oleosa*

*S. oleosa* tergolong tumbuhan dikotil (berkayu) yang memiliki perawakan terna hingga pohon. Pohon *S. oleosa* dapat ditemukan di daerah *terrestrial* serta tumbuh liar di lahan yang terdapat banyak vegetasi pohon Jati (IUCN, 2019; Siahaan, 2017). Ciri morfologi tanaman *S. oleosa* (*Schleichera oleosa*) menurut Goswami & Singh (2017) ialah daun *S. oleosa* bersirip genap dan daun muda terdapat pigmen berwarna kemerahan.



**Gambar 2.1.1.1 Morfologi *S. oleosa*** a. Daun Muda (Kemerahan), b. Daun Sedang (Hijau Muda), c. Daun Tua (Hijau Tua), d. Buah Muda, e. Tangkai bunga dan bunga), f. Kanopi Pohon (Dokumentasi pribadi).

Heyne (1987) menyatakan bahwa *S. oleosa* memiliki permukaan kulit batang yang halus dan berwarna abu-abu. Disaat muda batangnya terdapat trikoma berupa bulu halus berwarna kuning kemerahan. Daun *S. oleosa* berbentuk lanset dengan duduk daun berseling serta memiliki pertulangan menyirip. Bunga *S. oleosa* majemuk bertandan berada pada ujung ketiak atau diujung batang, memiliki duri, dan mahkota berwarna putih. Buah *S. oleosa* berbentuk bulat dengan warna kulit coklat kehitaman. *S. oleosa* merupakan tumbuhan dikotil dengan bentuk akar tunggang dan berwarna coklat muda.

### 2.1.2 Klasifikasi *S. oleosa*

*Kosambi* atau *Kesambi* (*Schleichera oleosa*) adalah tumbuhan dengan jenis kayu yang berasal dari India yang kemudian tersebar di wilayah Asia Tenggara termasuk Indonesia (Gambar 2.1.4.1) (IUCN, 2019; Siahaan, 2017). *S. oleosa* memiliki klasifikasi yakni sebagai berikut:

Kingdom: Plantae

Divisi: Magnoliophyta

Kelas: Rosidae

Ordo: Sapindales

Famili: Sapindaceae

Genus: *Scheleichera*

Spesies: *Scheleichera oleosa*

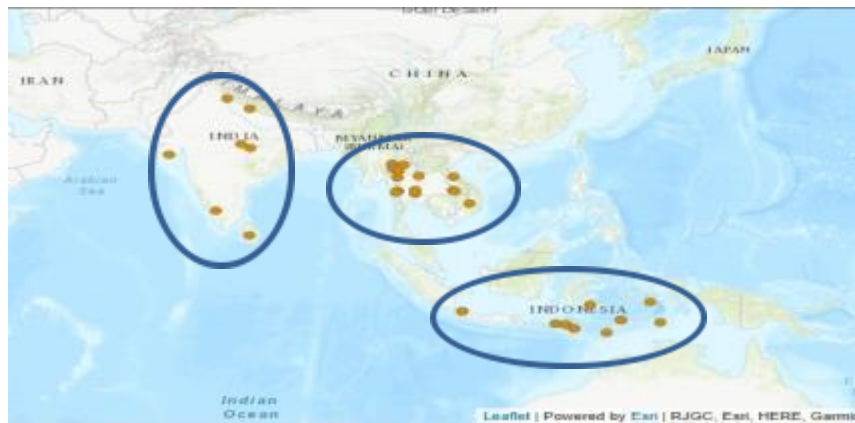
(NCBI, 2019).

### 2.1.3 Habitat *S. oleosa*

*S. oleosa* biasanya ditanam pada daerah pantai dengan ketinggian 250 mdpl yang beriklim kering hingga ketinggian 600 mdpl yang beriklim cukup lembab. *S. oleosa* di Pulau Jawa ditemukan pada ketinggian rendah, namun dapat juga ditemukan pada ketinggian hingga (900–1200) m. *S. oleosa* membutuhkan curah hujan tahunan 750 – 2500 mm. Tumbuhan ini mampu hidup pada suhu maksimum 35–47.5°C dan suhu minimum 25°C. *S. oleosa* dapat tumbuh dengan kondisi tanah kering, hingga kondisi tanah yang berawa. Kondisi tanah habitat *S. oleosa* dapat berbatu, kerikil, liat, dan tanah yang sedikit asam. Kawasan hutan produksi yang tidak produktif dan lahan kritis di luar kawasan hutan dapat ditanami *S. oleosa* (Iwasa, 1997 dalam Agussalim, 2012). Umumnya di Pulau Jawa tanaman *S. oleosa* tumbuh di daerah hutan dengan populasi pohon Jati yang padat (Meshram *et al.*, 2015).

### 2.1.4 Distribusi *S. oleosa*

*S. oleosa* secara umum dapat tumbuh pada ketinggian kurang dari 1000 mdpl, lebih tepatnya di ketinggian 600 mdpl (Heyne, 1987). *S. oleosa* merupakan tumbuhan hutan yang adaptif sehingga dapat tumbuh alami dengan tinggi hingga 40 m dan lebar diameter batang 2 m. *S. oleosa* tumbuh tersebar di wilayah lembah Himalaya, Srilangka hingga wilayah Asia Tenggara seperti Malaysia dan Indonesia. *S. oleosa* di Indonesia tumbuh baik di daerah Jawa, Bali, Nusa Tenggara, Sulawesi, Maluku, Pulau Seram dan Pulau Kai. Di Jawa Timur dapat ditemukan di Panarukan, Probolinggo, Pasuruan dan Besuki. (Siahaan, 2017).



**Gambar 2.1.4.1 Peta persebaran *S. oleosa* (IUCN, 2019)**

Persebaran *S. oleosa* di beberapa daerah Indonesia khusus nya di Kota Malang dipengaruhi oleh faktor lingkungan (eksternal). Faktor tersebut diantaranya; iklim (cuaca), topografi (ketinggian), media berupa tanah (edafik), serta komponen biotik lainnya seperti ketersediaan air, unsur hara, keadaan suhu (kelembapan) dan intensitas cahaya (Syafei, 1994). Ketersediaan komponen biotik yang optimal sebagai penunjang munculnya vegetasi tumbuhan di suatu wilayah telah Allah sampaikan dalam QS Al-A'raf [7]: 57- 58 yang berbunyi:

وَهُوَ الَّذِي يُرْسِلُ الرِّيحَ بُشْرًا بَيْنَ يَدَيْ رَحْمَتِهِ ۖ حَتَّىٰ إِذَا أَقْلَّتْ سَحَابًا ثِقَالًا سُقْنَاهُ لِبَلَدٍ مَّيِّتٍ فَأَنْزَلْنَا بِهِ الْمَاءَ فَأَخْرَجْنَا بِهِ مِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ ۚ كَذَٰلِكَ نُخْرِجُ الْمَوْتَىٰ لَعَلَّكُمْ تَذَكَّرُونَ  
 وَالْبَلَدُ الطَّيِّبُ يَخْرِجُ نَبَاتَهُ بِإِذْنِ رَبِّهِ ۖ وَالَّذِي خَبُثَ لَا يَخْرِجُ  
 إِلَّا نَكِدًا ۚ كَذَٰلِكَ نُصَرِّفُ الْآيَاتِ لِقَوْمٍ يَشْكُرُونَ

Artinya: Dan Dialah yang meniupkan angin sebagai pembawa berita gembira sebelum kedatangan rahmat-Nya (hujan); hingga apabila angin itu telah membawa awan mendung, Kami halau ke suatu daerah yang tandus, lalu Kami turunkan hujan di daerah itu, maka Kami keluarkan dengan sebab hujan itu berbagai macam buah-buahan. Seperti itulah Kami membangkitkan orang-orang yang telah mati, mudah-mudahan kamu mengambil pelajaran (57). Dan tanah yang baik, tanam-tanamannya

*tumbuh subur dengan izin Allah dengan pemeliharannya: dan (tanah) yang buruk, tanam-tanamannya tumbuh merana. Demikianlah Kami menjelaskan berulang-ulang tanda-tanda (kebesaran Kami) bagi orang-orang yang bersyukur (58) (QS Al-A'raf [7]:57-58).*

Berdasarkan QS Al-A'raf [7]: 57 tersebut, telah ditafsirkan menurut tafsir *Al-Mukhtashar* yang berbunyi: Allah menurunkan air (الْمَاءُ) dari awan yang mendung sehingga turun air hujan. Berhembus awan tersebut yang berisikan embun (air) ke daerah yang bertanah tandus. Tanah yang kering (tandus) apabila terkena air maka akan diserap air tersebut kemudian disimpan di dalam pori-pori tanah. Dari tanah itulah Allah dengan kuasanya menumbuhkan berbagai macam tumbuhan. Adapun pengertian menurut tafsir *Ibnu Katsir* yakni pada kalimat وَهُوَ الَّذِي يُرْسِلُ الرِّيَّاحَ بُشْرًا (Dan Allah lah yang meniupkan angin sebagai pembawa berita gembira) Maksudnya, angin itu bertiup menerbangkan awan yang membawa air hujan. Dan kalimat: بَيْنَ يَدَيْ رَحْمَتِهِ (Sebelum kedatangan rahmat-Nya) yang dimaksud adalah sebelum kedatangan hujan. Kemudian berhubungan langsung dengan ayat berikutnya yakni QS Al-A'raf [7]: 58 dengan tafsir yang sama yakni tafsir *Al-Mukhtasar* yang berbunyi: Wilayah/daratan berupa tanah dalam kalimat وَالْبَلَدُ الطَّيِّبُ apabila memiliki keadaan yang baik maka tanam-tanaman akan tumbuh subur atas izin Allah. Sebaliknya dalam kalimat وَالَّذِي خَبُثَ apabila kualitas tanah tersebut buruk/tidak subur maka atas izin Allah tanaman akan sukar untuk tumbuh (Tafsir *Al-Mukhtasar*). Adapun tafsir *ibnu katsir* menyatakan bahwa pada kalimat وَالْبَلَدُ الطَّيِّبُ يَخْرُجُ نَبَاتُهُ بِإِذْنِ رَبِّهِ (Dan tanah yang baik, tanaman-tanamannya tumbuh subur dengan seizin Allah) Maksudnya, tanah yang baik akan menumbuhkan tumbuh-tumbuhan dengan cepat dan baik. Adapun makna pada kalimat وَالَّذِي خُبُثَ لَا يَخْرُجُ إِلَّا نَكِدًا (Dan tanah yang tidak subur, tanaman-tanamannya

hanya tumbuh susah payah) Mujahid dan ulama lainnya mengatakan, seperti misalnya, tanah yang berair (lembab serta asin) dan lain sebagainya (Tafsir *Ibnu Katsir*).

Tafsir surah QS Al-A'raf [7]:57-58 tersebut apabila dikaitkan terhadap kajian integrasi bidang biologi, maka dapat disimpulkan bahwa tanaman tidak dapat tumbuh secara optimal tanpa adanya komposisi air yang cukup serta keadaan tanah yang tidak subur/kurangnya unsur hara. Air tanah berfungsi sebagai komponen utama organ tanaman dan biota tanah. Sebagian besar ketersediaan dan penyerapan hara oleh tanaman dimediasi oleh air, malah unsur-unsur mobil seperti N, K dan Ca dominan diserap tanaman melalui bantuan mekanisme massa air, baik ke permukaan akar maupun transportasi ke daun. Oleh karena itu, tanaman yang mengalami defisiensi (kekurangan) air tidak saja akan layu tetapi juga akan mengalami defisiensi hara (Zuhaidah dan Kurniawan, 2018).

### **2.1.5 Pemanfaatan *S. oleosa***

Tanaman Kosambi (*Schleicera oleosa*) memiliki manfaat di setiap organnya. Manfaat *S. oleosa* berguna dalam pemenuhan kebutuhan seperti batangnya dapat digunakan sebagai bahan dasar perahu kayu dan kayu bakar. Kulit batang dapat dimanfaatkan sebagai bahan dasar kosmetik (Zat Astringent) (Meshram *et al.*, 2015). Dalam hal pengobatan kulit batang mampu meredakan demam dan pembengkakan kelenjar getah bening. Getah kulit batang *S. oleosa* diduga dapat mengobati penyakit diare, malaria dan disentri (Goswami & Singh, 2017). Daun *S. oleosa* bermanfaat sebagai pakan ternak, dan sebagai obat dapat mengobati penyakit kulit seperti eksim (Meshram *et al.*, 2015).



Organ tanaman *S. oleosa* yang paling banyak dimanfaatkan dan oleh masyarakat yakni penggunaan minyak dari biji sebagai obat herbal dan pengembangan biodiesel. Sebagai obat herbal minyak biji *S. oleosa* dapat mengobati penyakit kulit, bisul, dan luka bakar. Minyak biji *S. oleosa* dapat digunakan sebagai minyak rambut tradisional dan sebagai bahan anti diabetes (Goswami & Singh, 2017). Menurut Meshram *et al.* (2015) Minyak biji *S. oleosa* berwarna coklat kekuningan, semi-padat, dengan aroma kacang almond yang pahit.

Selain pemanfaatannya sebagai herbal alami pohon *S. oleosa* merupakan salah satu pohon penghijauan kota karena dapat mengurangi polusi karbondioksida. *S. oleosa* memiliki kanopi yang cukup lebar sehingga dapat memberikan asupan O<sub>2</sub> yang tinggi. *S. oleosa* yang tergolong kedalam famili sapindaceae ini adaptif tumbuh pada ketinggian rendah hingga sedang yakni 100-650 mdpl. Pada ketinggian tersebut kelembapan cenderung rendah dan suhu cukup hangat sehingga *S. oleosa* memiliki kemampuan dalam menyerap CO<sub>2</sub> tinggi (Suita, 2012; Sanusi, 2018).

## 2.2 Variasi Genetik

Sekuen gen tiap individu makhluk hidup tidak sama. Pada bagian sekuen tertentu terdapat perbedaan genetik dan perbedaan inilah yang disebut dengan polimorfisme dari suatu spesies (Ellegren & Galtier, 2016). Polimorfisme merupakan suatu tanda dari adanya keragaman genetik. Keragaman genetik tersebut dapat merefleksikan keseimbangan antara ada dan tidaknya variasi genetik pada suatu alel. Alel baru yang muncul atau alel yang hilang pada suatu generasi bisa dikarenakan oleh mutagen atau bahkan kerusakan DNA saat bereplikasi. Tetapi tidak semua kejadian mutasi berakibat merugikan, misalnya dalam rangka

beradaptasi yang justru bisa menjadikan suatu spesies dapat sintas (Ellegren & Galtier, 2016).

Apabila semua individu dari suatu spesies adalah identik, maka tiap spesies tidak dapat beradaptasi secara genetis dengan lingkungan yang berubah. Sebaliknya, jika tiap individu secara genetis bervariasi maka akan memiliki kinerja yang lebih baik. Hal tersebut dikarenakan berbagai genotipe memfasilitasi mereka selama masa pertumbuhan. Pada tingkat populasi, pentingnya variasi genetis dapat ditunjukkan dengan menunjukkan bahwa keberhasilan suatu populasi tergantung pada variabilitas genetis dalam tubuh populasi (Lundqvist *et al.*, 2008).

Keragaman genetis merupakan kunci parameter pada lingkup evolusi biologi dan genetika populasi. Hal tersebut berhubungan terhadap kemampuan evolusi populasi, adaptasi, kesimpulan dari struktur populasi, serta spesiasi. Keragaman genetis mencerminkan interaksi mutasi, pergeseran genetis, seleksi, rekombinasi dan aliran gen pada variasi urutan DNA (Dutoit *et al.*, 2017). Keragaman genetis pada makhluk hidup terjadi melalui mekanisme mutasi dan rekombinasi. Salah satu pendekatan yang digunakan untuk menilai keragaman genetis adalah dengan DNA barcoding, sehingga dapat diketahui pula hubungan kekerabatan berdasarkan variasi genetis dan prosentase gen yang homolog (Nurhasanah *et al.*, 2019).

### **2.3 Rekonstruksi Filogenetik**

Rekonstruksi filogenetik organisme adalah tujuan utama biologi setelah publikasi teori Darwin tentang evolusi organisme (Darwin, 1859). Munculnya tanaman darat (embriofit) adalah salah satu peristiwa terbesar dalam sejarah makhluk hidup, yang menyebabkan proses evolusi ireversibel dalam pembentukan kehidupan di bumi. Pada tahap awal studi molekuler, gen tunggal sering digunakan

tanpa taksa yang luas, menghasilkan hipotesis filogenetik yang dipertanyakan. Namun, spekulasi palsu berakhir setelahnya munculnya metode proses sekuensing DNA & RNA secara otomatis memungkinkan penggunaan gen yang lebih sistematis. Berdasarkan metode tersebut terdapat bukti signifikan yang mendukung perkembangan filogenetik. Selain itu, teknologi modern, sangat berkembang salah satunya teknologi sequencing. Hal tersebut dapat memudahkan penyelidikan terhadap jumlah taksa dan meningkatkan pemahaman peneliti dalam masalah pemecahan studi rekonstruksi filogenetik yang cukup rumit (Mordvintseva *et al.*, 2015).

Analisis filogenetik digunakan untuk mengetahui rekonstruksi sejarah dan evolusi suatu ciri-ciri khas spesies sehingga diperoleh struktur hubungan kekerabatan. Teknik analisis filogenetik memetakan sifat-sifat yang menarik (dalam hal ini keturunan dan habitat) (Opie *et al.*, 2014). Analisis filogenetik sangat erat kaitannya dengan proses evolusi. Evolusi merupakan proses spesies yang umum hingga menjadi kompleks. Hal tersebut terjadi karena akumulasi perubahan sifat (variasi genetik) tiap generasi. Generasi muda akan memiliki sifat yang berbeda dari generasi nenek moyang nya seiring berjalannya evolusi. Menganalisis variasi genetik anatra populasi dapat dilihat dari perhitungan jarak genetik dan jumlah perbedaan basa polimorfisme tiap lokus gen populasi didasarkan dengan sekuen DNA (Dharmayanti, 2011).

Jenis analisis yang diketahui dengan baik yakni analisis filogenetik atau *cladistics* yang berarti *clade* atau kelompok keturunan dari satu nenek moyang yang sama. Analisis filogenetik biasanya disajikan seperti sistem percabangan, membentuk suatu diagram pohon yang dikenal sebagai pohon filogenetika. Apabila

sekuen nukleotida atau protein dari dua organisme yang berbeda terdapat kemiripan, maka kedua organisme tersebut diduga diturunkan dari sekuen *common ancestor*. Sekuen penjejeran akan menunjukkan dimana posisi sekuen tidak berubah/*conserved* dan juga dapat menunjukkan letak perbedaan atau *divergent* sehingga diketahui perbedaan sekuen dari *common ancestor*. Studi yang terkait dengan sekuen biologi, tidak dapat dihindarkan dari penjejeran sekuen/*alignment*. Tujuan dari proses penjejeran yakni mencocokkan karakter homolog, yaitu karakter yang mempunyai nenek moyang yang sama (Kemena & Notredame, 2009).

Metode konstruksi pohon filogenetika dapat diklasifikasikan menjadi 2 kategori sebagai metode terbaik untuk menghasilkan konstruksi sebuah pohon filogenetika. Kategori pertama yakni dengan memeriksa sejumlah besar kemungkinan model pohon filogenetik dan memilih satu yang terbaik dengan kriteria-kriteria tertentu. Proses pada kategori tersebut biasa disebut dengan metode *exhaustive search*. Metode yang memiliki model *exhaustive search* yakni metode seperti *Maximum Parsimony*, *Fitch Margoliash* dan *Maximum Likelihood* yang termasuk dalam kategori ini. Kategori yang kedua yakni dengan memeriksa hubungan topologi lokal dari pohon dan mengkonstruksi pohon terbaik dengan langkah demi langkah (jarak). Metode yang menerapkan konsep kategori kedua ini adalah metode seperti *Neighbor-joining* dan beberapa metode *Distance* lainnya (Saitou & Imanishi, 1989). Beberapa rekonstruksi pohon yang sering digunakan sebagai acuan adalah: (1) *Maximum parsimony*, (2) *Distance*, (3) *Neighbor-Joining*, dan (4) *Maximum likelihood*. Rekonstruksi tersebut secara umum digunakan untuk membentuk pohon evolusi atau pohon filogenetik untuk mengamati variasi sekuen

pada intraspecies maupun interspecies. Masing-masing metode ini digunakan untuk tipe analisis yang berbeda (Mount, 2001).

### **2.3.1 Maximum Parsimony**

*Parsimony* atau metode *minimum evolution* pertama kali digunakan dalam filogenetik oleh Camin and Sokal pada tahun 1965 (Felsenstein, 1978). Metode ini memprediksikan pohon evolusi (*evolutionary tree*) yang meminimalkan jumlah langkah yang dibutuhkan untuk menghasilkan variasi yang diamati dalam sekuen. Metode ini juga sering disebut sebagai metode evolusi *minimum/minimum evolution method*. *Multiple sequence alignment* dibutuhkan untuk memprediksi posisi sekuen yang diduga berhubungan. Posisi ini akan menampilkan kolom vertikal dalam *multiple sequence alignment*. Metode ini berguna untuk sekuen yang mirip dan dalam jumlah yang sedikit. Algoritma yang digunakan tidak rumit tetapi dapat membentuk rekonstruksi pohon terbaik, sebab semua kemungkinan pohon yang terbentuk berhubungan dengan kelompok sekuen yang diperiksa (Dharmayanti, 2011).

### **2.3.2 Distance**

Metode jarak bekerja pada jumlah perubahan diantara masing-masing pasangan dalam kelompok untuk mengkonstruksi pohon filogenetika dalam kelompok. Pasangan sekuen yang mempunyai jumlah perubahan terkecil diantara mereka disebut *neighbors*. Sekuen-sekuen ini menggunakan secara bersama-sama satu titik (*nodes*) atau posisi *common ancestor* kemudian masing-masing dihubungkan titik oleh sebuah cabang pada suatu konstruksi pohon filogenetik. Tujuan dari metode jarak adalah metode untuk mengidentifikasi pohon pada posisi *neighbors* dengan benar, dan juga mempunyai cabang yang menghasilkan data

orisinil sedekat mungkin. Penemuan *neighbors* terdekat diantara kelompok sekuen dengan metode jarak biasanya langkah pertama dalam memproduksi sebuah *multiple sequence alignment* (Pangestika dkk., 2015).

### **2.3.3 Neighbor-Joining**

Metode *neighbor-joining* sangat mirip dengan metode Fitch dan Margoliash kecuali tentang pemilihan sekuen untuk berpasangan ditentukan oleh perbedaan alogaritma. Metode *neighbor-joining* merupakan metode yang sangat cocok ketika rata-rata evolusi dari pemisahan usia (*lineage*) berada di bawah pertimbangan yang berbeda-beda. Ketika panjang cabang dari suatu pohon yang diketahui topologinya berubah dengan cara menstimulasi tingkat yang bervariasi dari perubahan evolusi, metode *neighbor-joining* adalah yang paling cocok untuk memprediksi pohon dengan benar (Saitou & Mei, 1987). *Neighbor-joining* memilih sekuen yang jika digabungkan akan memberikan estimasi terbaik dari panjang cabang yang paling dekat merefleksikan jarak yang nyata diantara sekuen (Dharmayanti, 2011).

## **2.4 Gen Kloroplas**

Kloroplas memainkan peran penting dalam mempertahankan kehidupan di bumi. Ketersediaan lebih dari 800 sekuen kloroplas genom dari berbagai tanaman telah ditingkatkan. Pemanfaatan dibidang biologi kloroplas, intraseluler, transfer gen, konservasi, keanekaragaman, merupakan dasar dimana gen kloroplas dapat direkayasa dapat meningkatkan sifat agronomi tanaman atau untuk menghasilkan produk pertanian atau biomedis yang bernilai tinggi (Daniel *et al.*, 2016).

### **2.4.1 matK**

Gen matK (maturase K) yang sebelumnya dikenal sebagai orfK, muncul sebagai gen lain dengan kontribusi potensial untuk tanaman sistematika molekuler

dan evolusi. Gen *matK* memiliki panjang sekitar 1500bp. Letak gen ini berada pada intron gen kloroplas *trnL* (Hilu & Liang, 1997). Penggunaan gen *matK* efektif untuk menyusun hubungan kekerabatan filogenetik baik intraspesifik maupun interspesifik antar tanaman berbunga bahkan seluruh Angiospermae. Gen *matK* tersebut lebih banyak digunakan sebagai dasar penyusunan sistematik Angiospermae dibandingkan gen-gen lainnya karena mempunyai jumlah yang lebih besar dalam hal substitusi nukleotida, mutasi nonsynonymous dan adanya peristiwa insersi dan delesi (Subositi & Widodo, 2010).

#### **2.4.2 *trnL-F***

Rangkaian gen *trnL* merupakan salah satu gen pada genom kloroplas dan telah banyak digunakan untuk menelaah hubungan evolusi dalam berbagai tingkatan takson. *trnL* merupakan daerah yang tidak menghasilkan kode genetik (non-coding regions) dari genom kloroplas (Yulita, 2010). Gen *trnL-F* merupakan gen kloroplas yang informatif dan mampu menunjukkan hubungan antar jenis sehingga sangat cocok digunakan dalam identifikasi hingga tingkatan jenis, uniparental maupun mendeteksi hingga tingkatan hibrida. Oleh karena itu, gen *trnL-F* mempunyai *substitution rate* tertinggi dibanding *matK* dan *rbcL* (Lestari, dkk 2018).

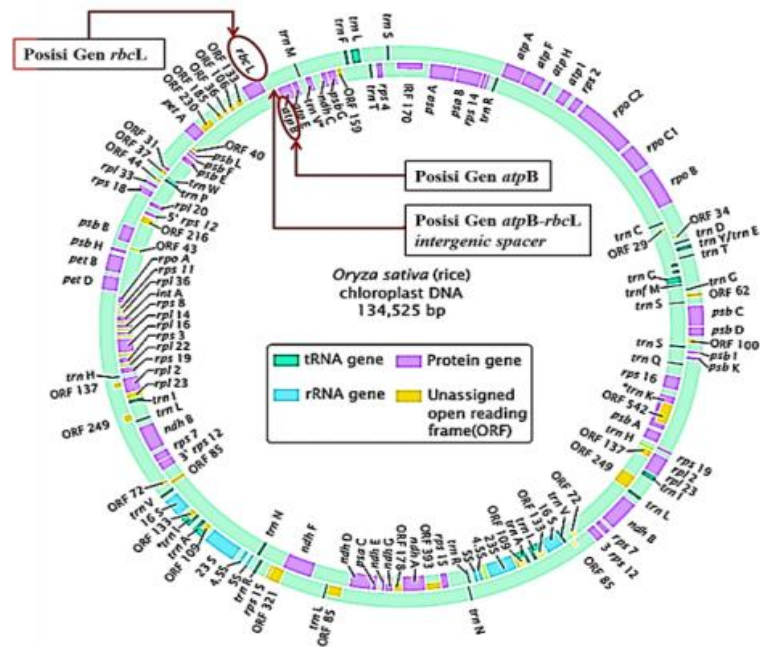
#### **2.4.3 *rbcL***

*RbcL (large subunit ribulose 1,5 biphosphat carboxylase/oxygenase)* merupakan gen pengkode dengan panjang basepare 1430 bp (CBOL, 2009). Gen *rbcL* mengkodekan subunit besar dari enzim rubisco yang pada dasarnya mengandung enzim katalitik pada sisi aktifnya (Zhao *et al.*, 2017). Gen *rbcL* lebih stabil, dan lebih adaptif (Rafidah dkk., 2019). Akan tetapi apabila *rbcL* mengalami perubahan besar pada sekuennya, maka akan mengakibatkan perubahan aktivasi

enzim rubisco serta perubahan terhadap efisiensi pemanfaatan CO<sub>2</sub> pada tanaman (Zhao *et al.*, 2017). Keberadaan sekuen gen *rbcL* sebagai pengkode enzim rubisco yang stabil dan adaptif dapat digunakan sebagai marka molekuler untuk menganalisis hubungan kekerabatan genetik. Menurut (Chen *et al.*, 2015) sekuen *rbcS* memiliki kesamaan (homolog) dibawah 75% dibandingkan dengan *rbcL* yang memiliki kesamaan diatas 75% antar spesies tanaman. Berdasarkan data tersebut dapat disimpulkan bahwa *rbcS* kurang bersifat konservasi (lestari) dibandingkan dengan *rbcL*.

*RbcL* tergolong dalam cpDNA yang memiliki karakteristik genom berukuran kecil dengan struktur yang stabil. Genom bersifat konservatif dengan rataan substitusi nukleotida yang rendah sehingga tidak mengalami rekombinasi serta genom diturunkan secara uniparental (Basith, 2012). Chetia *et al.* (2016) menyatakan bahwa gen *rbcL* merupakan gen yang memiliki tingkat substitusi (mutasi) nukleotida sinonim rendah dibandingkan dengan gen pada inti sel, sehingga kemampuan untuk berevolusi menjadi lambat. Selain itu *rbcL* memiliki rantai polimorfisme panjang sebagai pembatas pada tingkatan taksonomi.





**Gambar 2.3.1 cpDNA (Gen Kloroplas) (Basith, 2012)**

Nurhasanah *et al.* (2019) menyatakan bahwa gen *rbcL* merupakan sekuen gen yang mempunyai mutasi paling rendah dibandingkan dengan sekuen gen yang lain di dalam genom kloroplas. Menggunakan *rbcL* sebagai penanda dapat menyelesaikan problematika filogenetik molekuler. Maka dari itu *rbcL* merupakan sekuen yang cocok untuk dijadikan marka/penanda dan studi identifikasi kekerabatan filogenetik suatu spesies. *RbcL* merupakan marka DNA barcoding dari genom kloroplas yang sangat umum. *RbcL* memiliki kualitas *bidirectional sequencing* yang tinggi, tidak memerlukan biaya banyak untuk analisis, memiliki diskriminatif yang tinggi antar tanaman angiosperm. *RbcL* memiliki kesuksesan paling tinggi saat amplifikasi PCR dibandingkan dengan marka genom kloroplas lainnya (Moura *et al.*, 2019).

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober 2020 sampai dengan bulan April 2021. Penelitian bertempat di Laboratorium Genetika Molekuler, Jurusan Biologi, Lt.1 Gedung Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

#### **3.2 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini dilakukan secara deskriptif kualitatif dan eksploratif. Penelitian ini menggunakan sekuen gen *rbcL* sampel daun *S. oleosa* (*Schleichera oleosa*) sebagai *ingroup* yang diperoleh dari berbagai lokasi di Malang Raya. *Outgroup* diambil dari sekuen gen *rbcL* famili sapindaceae yakni *Schleichera oleosa* di India, *Dimocarpus longan* dan *Litchi chinensis*. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis hubungan kekerabatan *S. oleosa* menggunakan marka molekuler gen *rbcL*.

#### **3.3 Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan adalah; Lux Meter, Alat ukur konsentrasi CO<sub>2</sub>, Erlenmeyer 250ml (*Iwaki*), Gunting, Gelas ukur 100ml (*Pyrex*), Pipet dan rubber, Kulkas, Mikropipet (*Bio-RAD*), Microwave (*U-Rolux*), Vortex (*Barnstead*), Water bath (*Memmert*), Micro Sentrifuge (*Bio-RAD*), Timbangan analitik (*Aosai*), Mortar dan pestle, Tip (Blue, Yellow, White) (*One-Med*), Tube 1,5 ml (*One-med*), Tube PCR (*One-Med*), Thermocycler (*Bio-RAD*), UV transiluminator/Gel Doc (*Bio-RAD*), Nanodrop (*A&E Lab*), Elektroforesis (*Bio-RAD*), LAF (*Bio-Base*), Komputer/Laptop.

Bahan yang digunakan adalah; Sampel daun tua tanaman Kesambi (*Schleichera oleosa*) CTAB (*Aplichem*), EDTA, Tris-HCL, PVP (*Aplichem*), akuades steril,  $\beta$ -mercaptoethanol (*Aplichem*), NaCl, nitrogen cair, khloroform, isopropanol (*Aplichem*), isoamil alcohol, etanol absolut, alkohol 70%, Buffer TE (*Thermo Scientific*), TBE (*Promega*), Agarose (*Science Preneur*), PCR mix (PCR buffer reaction, dNTP mix, Taq DNA polymerase) (*GoTaq Promega*) dan primer rbcL(F/R) (*BIONEER*), DNA Ladder 100 bp (*Promega*), ethidium bromide (ETBr).

### 3.4 Langkah Kerja

#### 3.4.1 Pengambilan Sampel

Pengambilan bagian daun tua tanaman *S. oleosa* dilakukan di beberapa tempat dengan ketinggian yang berbeda (Tabel 3.4.1), berikut adalah data koordinat beserta ketinggian tempat sampel pohon *S. oleosa*.

**Tabel 3.4.1.1. Nama, lokasi dan ketinggian tempat sampel *S. oleosa***

Sampel (Inisial)	Asal Sampel	Ketinggian
<b>Gondanglegi (GL)</b>	Jl. Panglima Sudirman, Kec. Gondanglegi, Kab. Malang	366 mdpl
<b>Turen (TR)</b>	Jl. Dharmawangsa, Kec. Turen, Kab. Malang	383 mdpl
<b>Blimbing (BL)</b>	Jl. Nikel, Blimbing, Kota Malang	460 mdpl
<b>Lowokwaru-Veteran (VT)</b>	Jl. Veteran, Kec. Lowokwaru, Kota Malang	500 mdpl
<b>Sukun (SK)</b>	Jl. Candi, Kec. Sukun, Kota Malang	560 mdpl
<b>Lowokwaru-Tidar (TD)</b>	Jl. Villa Bukit Tidar, Kec. Lowokwaru, Kota Malang	640mdpl

### 3.4.2 Isolasi DNA Tanaman

Isolasi yang dilakukan mengacu pada metode Adeyemi & Ogundipe (2012) dengan beberapa modifikasi. Hal pertama yang dilakukan adalah perlakuan pra isolasi yakni membersihkan daun *S. oleosa* kemudian menimbang sampel daun *S. oleosa* masing-masing sebanyak 300 mg. Selanjutnya kegiatan isolasi, sampel yang sudah disiapkan tersebut ditumbuk hingga membentuk serbuk/powder menggunakan nitrogen cair dengan media mortar dingin. Sampel yang sudah menjadi bubuk/powder dimasukkan ke dalam tube 1,5 ml. Masukkan buffer lisis yang sudah diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit sebanyak 1 ml pada tiap tube sampel. Buffer lisis yang digunakan berupa CTAB (2-Cetyltrimethylammonium bromide) 10% yang mengandung 100mM Tris-HCl, pH 8.0, 1,4 NaCl, 20mM EDTA, PVP, dan  $\beta$ -mercaptoetanol. Diinkubasi sampel pada suhu 65°C selama 20 menit. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 5 menit. Diambil supernatan sampel sebanyak 500 ml kemudian dipindahkan ke dalam tube baru. Dilakukan proses pengendapan metabolit sekunder, serta bahan kontaminan lain menggunakan reagen Choloroform, dan Isoamyl alkohol dengan perbandingan 24:1. Ditambah reagen tersebut ke dalam tube sampel hingga volume mencapai 1,5 ml kemudian di kocok perlahan. Sampel disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12000 rpm selama 15 menit. Sampel yang sudah di sentrifugasi terbagi menjadi 3 lapisan. Diambil lapisan bening paling atas sampel kemudian di pindah ke dalam tube baru. Dilakukan tahapan pemurnian DNA (purifikasi) menggunakan etanol absolut. Etanol absolut diberikan ke dalam tube sampel sebanyak 2 kali volume sampel. Sampel diinkubasi selama 24 jam pada suhu -20°C. Disentrifugasi kembali sampel yang sudah diinkubasi dengan

kecepatan 10000 rpm selama 10 menit. Diambil pellet sampel dengan membuang supernatant kemudian diangin-anginkan. Pellet sampel diberikan TE buffer sebanyak 30  $\mu$ l.

### **3.4.3 Uji Kuantitatif dan Kualitatif Sampel**

#### **3.4.3.1 Uji Kuantitatif**

Uji kuantitatif sampel mengacu pada Desjardins & Conklin (2010). Alat yang digunakan adalah NanoDrop yang memiliki prinsip alat spektrofotometri. Pengujian dimulai dengan menguji blank menggunakan aquades sebanyak 1  $\mu$ l. Kemudian pengujian sampel sebanyak 1  $\mu$ l untuk mengetahui kemurnian dan konsentrasi DNA. Kemurnian DNA dapat dilihat pada gelombang  $\lambda$ 260 dan  $\lambda$ 280. Penentuan kemurnian DNA menurut Desjardins & Conklin (2010) DNA murni pada rasio absorbansi  $\lambda$ 260/280 berada diantara panjang gelombang 1,8-2,0. Konsentrasi DNA dapat diperoleh dengan cara nilai absorbansi  $\lambda$ 260 dikalikan 50 dan dikalikan dengan faktor pengenceran (Lampiran 2).

#### **3.4.3.2 Uji Kualitatif**

Uji kualitatif sampel menggunakan alat elektroforesis dengan media padat agarose 1% dan visualisasi gel-doc dengan penyinaran UV. Disiapkan larutan Agarose 0,4 gr dengan pelarut TBE Buffer (1X) sebanyak 40 ml. Larutan agarose dihomogenkan dengan microwave selama 1 menit. Dituang larutan agarose pada tray yang sudah dipasang sisir sumuran. Gel agarose yang sudah dingin diletakkan pada chamber elektroforesis. Dituang larutan TBE buffer hingga gel terendam. Dihomogenkan campuran ddH<sub>2</sub>O 2  $\mu$ l loading dye 1  $\mu$ l dan sampel 3  $\mu$ l. Dimasukkan campuran tersebut ke dalam sumur gel agarose menggunakan mikropipet. Dielektroforesis gel 100 volt selama 30 menit. Gel agarose direndam

dalam ETBr selama 15 menit. Divisualisasikan hasil dengan alat UV-Transiluminator (Lampiran 1).

### 3.5 Amplifikasi dan Sekuensing Sampel

Amplifikasi sampel menggunakan thermal cycler berbasis PCR (*Polymerase Chain Reaction*) berdasarkan acuan Maloukh *et al.* (2017). Sebelum melakukan proses amplifikasi, terlebih dahulu dibuat *cocktail DNA* sebanyak 25 µl yang mengandung (DNA template sebanyak 1 µl, 12,5 µl Taq PCR Mix, 9,1 µl ddH<sub>2</sub>O, 1,2 µl forward primer rbcLF 10 pmol (AGT AGA CTT TGT TGC TGC GAG) 1,2 µl reverse primer rbcLR 10 pmol (ATC TAC CGT AGT TCT TAG CAG) (Lin & Ishiki, 2005). Siklus penggunaan thermal cycler dalam mengamplifikasi ada 3 yakni denaturasi, amplifikasi, dan elongasi. Siklus pra denaturasi diatur sebanyak 1 siklus dengan suhu 94°C selama 3 menit, denaturasi, amplifikasi, dan elongasi berturut-turut diatur masing-masing sebanyak 35 siklus dengan suhu (94°C selama 1 menit, 55°C selama 1 menit, dan 72°C selama 1 menit). Terakhir post elongasi diatur sebanyak 1 siklus dengan suhu 72°C selama 7 menit. Hasil amplifikasi PCR kemudian di elektroforesis dengan gel agarose 1,5% (0.3 gr serbuk agarose + 20 ml TBE 1X + 1 µl EtBr) diatur voltase 80V selama 30 menit dan divisualisasi menggunakan UV-transiluminator. Sampel DNA yang telah diamplifikasi dapat di sekuensing dengan metode sanger menggunakan jasa sekuensing DNA di 1<sup>st</sup> Base Malaysia

### 3.6 Analisis Data Sampel

#### 3.6.1 Analisis Data Sekuen dan Variasi Genetik

Pembacaan serta analisis data sekuen menggunakan piranti lunak (*software*) Geneious Prime v 2021.1.1 dan software SeqScanner v 2.0 untuk melihat kualitas

sekuen ditinjau dari nilai QV (Quality Value) (Lampiran 4). Kemudian hasil sekuen tersebut disejajarkan (alignment) agar diketahui apakah terdapat variasi genetik. Pensejajaran sekuen tersebut menggunakan program Clustal Omega. Hasil dari pensejajaran sekuen tersebut dianalisis menggunakan menu predict pada fitur software Geneious Prime v 2021.1.1, serta menggunakan software DnaSP 6.0 untuk mengetahui jumlah monomorfisme dan polimorfisme. Polimorfisme yang dimaksud seperti jenis, letak dan jumlah mutasi pada sekuen sehingga dapat diketahui keanekaragaman nukleotida (gen) (Yuliani dkk., 2017).

### **3.6.2 Analisis Filogenetik**

Analisis hubungan kekerabatan dengan cara membuat pohon filogenetik menggunakan perangkat lunak Geneious Prime v 2021.1.1. Menganalisis pohon filogenetik menggunakan rekonstruksi *Neighbor-joining* dengan model jarak Kimura 2 parameter. Bootstrap yang digunakan sebanyak 1000 ulangan (Dharmayanti, 2011).

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Analisis variasi genetik *S. oleosa* di Malang Raya berdasarkan marka gen *rbcL*

Sekuen gen *rbcL* *S. oleosa* tergolong *conserve* dimana terdapat lebih dari 90% yakni sebesar 93.2% gen yang terkategori *conserve* (Tabel 4.1.1). Namun jika dilihat dari total komponen GC, sekuen gen *rbcL* *S. oleosa* terkategori tidak *conserve* karena memiliki GC konten sebesar 44,5% lebih rendah dibandingkan dengan komponen AT sebesar 55,5%.

**Tabel 4.1.1 Variasi Genetik**

Jenis Variasi	Total Variasi	Urutan Basa Ke-
<b>GC content</b>	44,5%	-
<b>AT content</b>	55,5%	
<b>Concerv sites</b>	93,2%	-
<b>Singleton two variants</b>	2	582 dan 589
<b>Singleton three variants</b>	1	590
<b>Parsimony informative sites two variants</b>	3	585, 586, dan 588
<b>Parsimony informative sites three variants</b>	3	583, 584, dan 587

Menurut jurnal Ingkiriwang dkk. (2017) basa nukleotida dihubungkan dengan ikatan hidrogen. Terdapat tiga ikatan hidrogen yang dapat terbentuk di antara G dan C tetapi hanya dua yang terbentuk di antara A dan T. Komposisi pasangan basa menyebabkan adanya perbedaan titik lebur DNA. Semakin tinggi kandungan pasangan basa G dan C, semakin tinggi titik lebur DNA. Hal ini disebabkan karena pasangan G dan C lebih stabil dan memerlukan lebih banyak energy panas untuk



menguraikannya dibandingkan dengan pasangan A dan T. Hal ini terjadi karena pasangan basa G dan C memiliki tiga ikatan hidrogen, sedangkan pasangan A dan T hanya memiliki dua ikatan hydrogen. Komponen GC yang tinggi dibandingkan dengan komponen AT dipengaruhi oleh lokasi gen *rbcL* *S. oleosa* yang teramplifikasi memiliki banyak substitusi nukleotida atau terdapat SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Ismail *et al.* (2020) bahwa kandungan AT yang lebih tinggi daripada kandungan GC disebabkan oleh variabilitas yang tinggi dalam komposisi nukleotida dan tingkat substitusi nukleotida yang lebih tinggi pada gen yang teramplifikasi. Yustinadewi, dkk (2018) menambahkan bahwa persentase GC adalah persentase banyaknya guanin dan sitosin dalam suatu sekuen. %GC sebaiknya berada pada rentang 40-60%. Berdasarkan pendapat tersebut sekuen *rbcL* *S. oleosa* dengan %HQ sebanyak 93,2% dan %GC sebanyak 44,5% masih tergolong *conserve*.

Variasi yang terdeteksi pada ke enam sampel yakni terdapat 9 basa nukleotida yang berbeda. Polimorfisme terdapat pada panjang *base pairs* 580-590, yakni 10 basa terakhir pada panjang gen *rbcL* yang berhasil di sekuen. Variasi pada sekuen DNA sampel dapat diketahui saat dilakukan pensejajaran (*alignment*) (Morrison, 2015). Variasi yang dimaksud yakni polimorfisme. Polimorfisme merupakan perbedaan yang terdapat pada genotip (variasi genetik). Perbedaan tersebut menyebabkan DNA menghasilkan fenotip tertentu yang dapat mencirikan suatu individu (Singh & Kulathinal, 2013).

Berdasarkan hasil variasi genetik (Tabel 4.1.1) sekuen gen *rbcL* *S. oleosa* memiliki 2 jenis variasi yakni *singleton variable sites* dan *parsimony informative*. Variasi jenis *singleton* dengan 2 variasi terdapat sebanyak 2 jumlah. Variasi

tersebut terdapat pada urutan basa ke- 582 dan 589. Variasi *singleton* dengan 3 variasi sebanyak 1 variasi, yakni di urutan basa terakhir (590bp). Variasi jenis *parsimony informative* dengan 2 variasi terdapat sebanyak 3 jumlah. Variasi tersebut terdapat pada urutan basa ke-585, 586, dan 588. Variasi *parsimony informative* dengan 3 variasi terdapat sebanyak 3 jumlah. Variasi tersebut terdapat pada urutan basa ke-583, 584, dan 587. Menurut Jeon & Eom (2019); Hidayat & Pancoro (2008) situs *singleton* merupakan situs dimana hanya satu taksa yang memiliki nukleotida yang berbeda. *Singleton two variants* yakni situs yang memiliki dua jenis nukleotida berbeda dan pada situs tersebut terdapat satu taksa berbeda dengan yang lainnya. *Singleton three variants* yakni situs yang memiliki tiga jenis nukleotida berbeda dan pada situs tersebut terdapat dua taksa berbeda dengan yang lainnya. Software mengidentifikasi situs sebagai situs *singleton* jika terdapat minimal tiga kodon mengandung nukleotida atau asam amino yang jelas. Situs *parsimony informative* adalah posisi dalam rangkaian urutan yang relevan dimana setidaknya ada dua keadaan karakter (nukleotida) yang berbeda pada suatu sekuen. Masing-masing keadaan tersebut terjadi minimum dua.

Hubungan kekerabatan dapat dilihat dari prosentase kesamaan basa nukleotida, semakin banyak kesamaan maka hubungan kekerabatan antar sampel semakin dekat. Hal tersebut dapat mengelompokkan sampel ke dalam 1 kluster yang sama. Berdasarkan hasil tersebut dapat dilihat bahwa polimorfisme bisa terjadi pada sampel tertentu dengan lokasi *base pairs* yang berbeda, namun tetap berada di range 10 basa terakhir pada panjang gen *rbcl* yang berhasil di sekuen (580-590 bp). Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Menurut Yang *et al.* (2018) setiap individu memiliki SNP (*Single Nucleotide Polimorphism*) atau biasa disebut dengan mutasi

titik, dan pada spesies yang sama akan memiliki posisi SNP pada *range base pairs* yang sama pula.

Variasi genetik atau polimorfisme merupakan ciri yang membedakan individu satu dengan individu yang lain meskipun dalam satu spesies yang sama. Polimorfisme dapat terjadi sekalipun pada gen yang bersifat *conserve* seperti *rbcL*. Akan tetapi polimorfisme yang didapatkan lebih sedikit dibandingkan dengan gen yang tidak bersifat *conserve*. Hal tersebut dikarenakan gen yang tidak *conserve* lebih mudah mengalami mutasi secara spontan akibat dari perubahan lingkungan. Terjadinya perubahan basa nukleotida secara mutasi yang spontan menyebabkan adanya variasi genetik (polimorfisme). Mutasi spontan tersebut terjadi dikarenakan terdapat penggantian satu nukleotida dengan pasangannya di dalam untaian DNA komplementer dengan pasangan nukleotida lain. Pasangan basa nitrogen (basa N) pada DNA antara *timin* (T) dengan *adenine* (A) atau antara *guanine* (G) dengan *cytosin* (C) saling berhubungan tetapi ikatan hydrogen yang menghubungkan tergolong lemah. Atom-atom hydrogen dapat berpindah dari satu posisi ke posisi lain pada basa purin atau basa pirimidin. Perubahan kimia yang seperti itu disebut dengan perubahan tautomer. Peristiwa yang tidak normal seperti misalnya, adenin berpasangan dengan sitosin dan timin dengan guanin. Peristiwa perubahan genetik seperti itu disebut dengan mutasi gen karena hanya terjadi di dalam gen (Warmadewi, 2017; Brog, 2013).

Polimorfisme pada sekuen *rbcL* *S. oleosa* sebagai gen pengkode enzim rubisco tidak dipengaruhi oleh lingkungan, melainkan berasal dari sifat indukan yang diturunkan tiap individu yang berbeda serta perbedaan pada mutasi titik atau SNP. Hal tersebut dikarenakan keadaan CO<sub>2</sub> dan O<sub>2</sub> di lingkungan yang berbeda

menjadikan enzim rubisco disusun oleh dua holo enzim dari gen yang bersifat reaktif yakni gen *rbcS* dan non-reaktif yakni gen *rbcL*. Gen non-reaktif yang menyusun enzim rubisco adalah gen *rbcL* yang berasal dari kloroplas sehingga gen tersebut tidak mudah berubah atau bermutasi. Terdapat pula gen reaktif yang menyusun enzim rubisco yakni gen *rbcS*. Gen *rbcS* berasal dari nukleus sehingga gen tersebut mudah mengalami perubahan atau mutasi spontan.

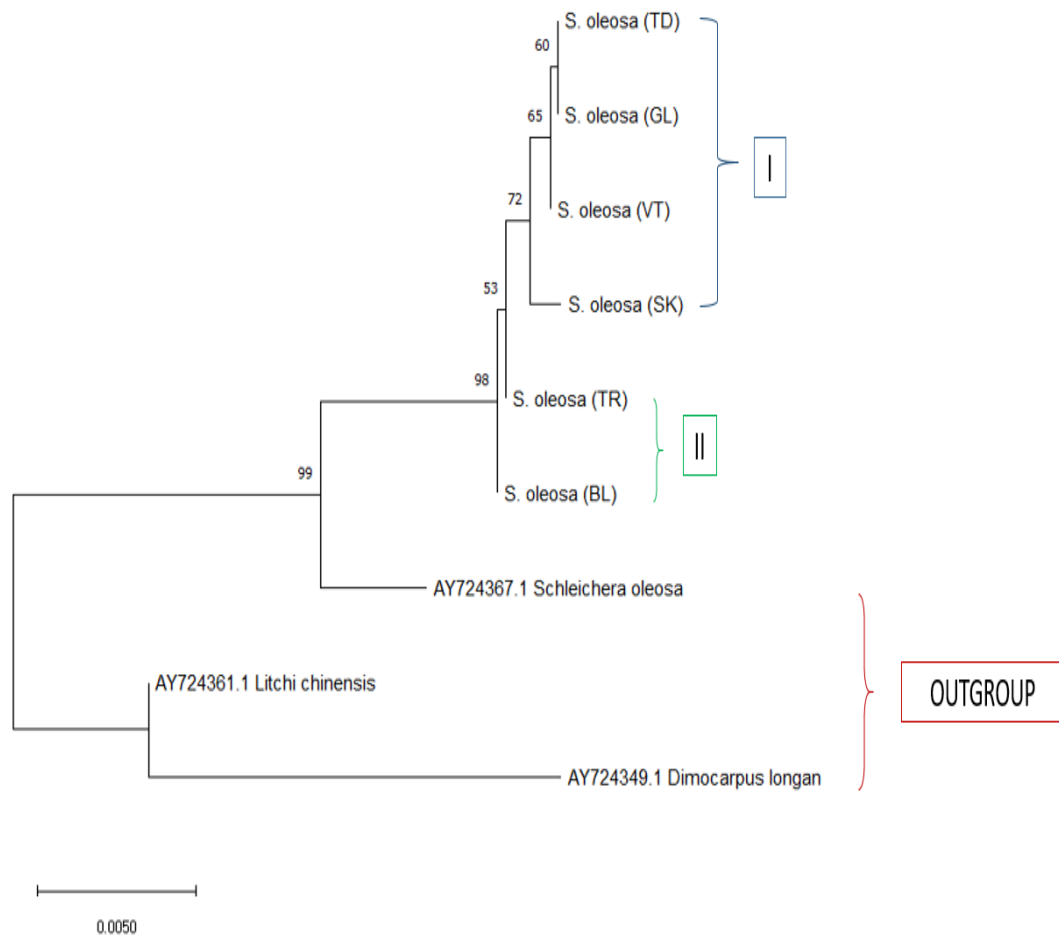
Sifat tersebut menjadikan gen *rbcL* bersifat konservatif dan memiliki kesamaan homolog diatas 90% dalam satu spesies. Hal yang menyebabkan tanaman *S. oleosa* bersifat adaptif pada lingkungan yang kadar CO<sub>2</sub> dan O<sub>2</sub> berbeda yakni dikarenakan pada saat pembentukan enzim rubisco tidak hanya dikode oleh gen *rbcL* tetapi juga dikode oleh gen *rbcS* yang bersifat reaktif (*non- conserve*). Gen *rbcS* memiliki polimorfisme tinggi dikarenakan bentuk adaptasinya terhadap lingkungan yang cukup tinggi (Chen *et al.*, 2015).

Variasi yang terdapat pada 10 basa terakhir (*range base pairs* 580-590) merupakan dasar untuk mengetahui hubungan kekerabatan *S. oleosa* di Malang Raya yang terbentuk pada rekonstruksi pohon filogenetik. Hasil analisis variasi pada sekuen gen *rbcL* *S. oleosa* di Malang Raya menunjukkan adanya lokasi SNP pada spesies tersebut.

#### **4.2 Hubungan Kekerabatan *S. oleosa* di Malang Raya Berdasarkan Sekuen Marka Gen *rbcL***

Hasil dari sekuen *S. oleosa* yang dilakukan menunjukkan hasil yang bagus dibuktikan dari nilai QV20+ yang tinggi berdasarkan analisis menggunakan software SeqScanner (Lampiran 4 dan 5). Selain itu % HQ sekuen seluruh sampel lebih dari 90% berdasarkan analisis sekuen menggunakan software Geneious Prime

v 2021.1.1. Hasil sekuen yang baik dapat dijadikan sebagai acuan untuk membentuk skema pohon filogenetik (*cladogram*) (Gambar 4.2.1).



**Gambar 4.2.1 Pohon Filogenetik *S. oleosa* berdasarkan sekuen *rbcL* dengan metode *Neighbor Joining* I)** Bibit *S. oleosa* (TD:Tidar-Lowokwaru, GL:Gondanglegi, VT:Veteran-Lowokwaru, SK:Sukun) berasal dari Probolinggo, Jawa Timur. II) Bibit *S. oleosa* (TR:Turen, BL: Blimbing) berasal dari Mojokerto, Jawa Timur.

Sekuen yang berhasil dilakukan menurut Hardiarto dkk, (2015) adalah sekuen basa nukleotida yang memiliki grafik memuncak, serta nilai QV yang bagus ditandai dengan sekuen basa error dibawah 1%. Gaffar & Sumarlin (2020) menambahkan bahwa terdapat dua acuan dalam menilai hasil sekuen ditinjau dari

prosentase *pure & mixed base QV*. *Pure base QV* adalah basa nukleotida yang jelas terbaca (A,G,T,dan C). *Mixed base QV* adalah basa nukleotida yang ambigu tidak dapat dibedakan jenis basanya atau tidak jelas terbaca, sehingga pada hasil sekuen tersebut akan disimbolkan dalam huruf N. Sekuen dapat dikatakan baik apabila memiliki prosentase *pure base QV*  $\geq 20$  (QV 20+) yang tinggi dan nilai *mixed base QV* rendah serta tingkat error yang tidak lebih dari 1%.

Berdasarkan rekonstruksi pohon filogenetik tersebut dapat diketahui bahwa ke-6 sampel *S. oleosa* di Malang Raya memiliki hubungan kekerabatan yang sangat dekat. Sampel *S. oleosa* dengan inisial (TD, GL, VT, SK, TR dan BL) merupakan *ingroup* yang memiliki nilai percabangan diatas 50. Hal tersebut menandakan karakter apomorfik/sinomorfik yang sama telah diturunkan pada karakter monofiletik pada sampel tersebut sehingga dapat membentuk suatu kluster (Pangestika dkk, 2015). Berdasarkan panjang cabang (jarak genetik) menandakan bahwa ke-6 sampel *S. oleosa* di Malang Raya memiliki hubungan kekerabatan yang hampir sama. Menurut Tallei *et al.* (2016) semakin kecil jarak genetik antara dua individu maka akan semakin dekat hubungan kekerabatannya.

Terdapat 2 sampel *S. oleosa* yang berdasarkan nilai percabangan cukup minim terhadap sampel lain meskipun tetap berkerabat dekat, sampel tersebut adalah BL dan TR. Sampel BL dan TR memiliki nilai percabangan cukup tinggi yakni 98 sedangkan nilai percabangan sampel TR dengan sampel SK memiliki nilai percabangan yang cukup rendah yakni 53. Hal tersebut diduga karena bibit sampel BL dan TR berasal dari tempat pembibitan yang sama yakni Mojokerto, Jawa Timur. Sampel TD, GL, VT, dan SK berasal dari tempat pembibitan dari Probolinggo, Jawa Timur.

Perbedaan asal pembibitan sampel tersebut dapat menyebabkan bibit sampel dari tempat yang sama semakin berkerabat dibandingkan dengan bibit sampel dari tempat yang berbeda. Hal tersebut dikarenakan pada berbagai asal tempat pembibitan memungkinkan dijumpai satu indukan. Menurut Chen *et al.* (2015) *rbcL* merupakan sekuen gen pada gen kloroplas yang diturunkan langsung oleh indukan. Apabila ditemukan suatu sampel sekuen dari gen *rbcL* dengan sekuen yang minim variasi dan situs konservasi yang tinggi, maka dapat disimpulkan sampel tersebut berasal dari indukan yang sama. Berdasarkan pernyataan tersebut dapat disimpulkan bahwa sampel *S. oleosa* BL dan TR memiliki indukan yang sama. Sampel *S. oleosa* TD, GL, VT dan SK juga memiliki indukan yang sama.

Berdasarkan rekonstruksi pohon filogenetik tersebut model skema pohon filogenetik *Neighbor-Joining* dapat menggabungkan sekuen dengan estimasi terbaik serta lebih efisien berdasarkan panjang cabang terdekat. Metode yang berbasis jarak ini dipercaya sebagai metode rekonstruksi pohon evolusi yang paling cepat serta keakuratan topologi yang dihasilkan pada penelitian-penelitian sebelumnya (Li, 2015). Bootstrap yang diulang sebanyak 1000 kali merupakan bentuk keakuratan dari hasil rekonstruksi pohon filogenetik. Semakin banyak ulangan pada bootstrap maka akan meningkatkan keakuratan topologi pohon filogenetik tersebut (Hall, 2001).

Hubungan kekerabatan merupakan suatu istilah terhadap status intraspecies maupun interspecies yang memiliki prosentase kemiripan yang cukup tinggi, sehingga suatu species tersebut dapat dikatakan berkerabat. Hubungan kekerabatan perlu dianalisis untuk kepentingan mengklasifikasi suatu species agar dapat memudahkan dalam hal konservasi serta pemuliaan species tersebut. Analisis

hubungan kekerabatan dapat dilakukan dengan berbagai metode, baik secara morfologi, anatomi, serta molekuler. Hal tersebut sesuai dengan firman QS Al-An'am [6]: 99 yang berbunyi:

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ  
فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا نُخْرِجُ مِنْهُ حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ  
مِنْ طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ  
مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَبِهٍ أَنْظِرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ إِنَّ فِي  
ذَٰلِكُمْ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ ﴿٩٩﴾

Artinya: Dan Dialah yang menurunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan dengan air itu segala macam tumbuh-tumbuhan maka Kami keluarkan dari tumbuh-tumbuhan itu tanaman yang menghijau. Kami keluarkan dari tanaman yang menghijau itu butir yang banyak; dan dari mayang korma mengurai tangkai-tangkai yang menjulai, dan kebun-kebun anggur, dan (Kami keluarkan pula) zaitun dan delima yang serupa dan yang tidak serupa. Perhatikanlah buahnya di waktu pohonnya berbuah dan (perhatikan pulalah) kematangannya. Sesungguhnya pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman (QS Al-An'am [6]: 99).

Berdasarkan ayat tersebut Allah maha kuasa telah menumbuhkan berbagai macam tumbuhan yang dapat dijadikan sebagai sumber makanan. Allah tumbuhkan tumbuhan tersebut baik ada yang serupa maupun tak serupa, maksud dari hal tersebut adalah agar kita senantiasa memperhatikan bahwa tidak semua yang serupa itu sama, bisa saja tanaman/pohonnya sama akan tetapi buah dan rasanya berbeda ataupun sebaliknya. Menurut tafsir *Ibnu Katsir* maksud dari kata مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَابِهٍ adalah bentuk dari dedaunannya bisa tidak serupa, tetapi serupa bentuk buahnya. Bentuk buah nya yang serupa tetapi rasa, banyak buah yang dihasilkan, kandungan



serta manfaatnya berbeda. Dari perbedaan tersebut Allah memerintahkan untuk mengamati buahnya ketika berbuah saat masa panen tiba. Adapun tafsir menurut *Tafsir Al-Muyassar*/Kementrian Agama Saudi Arabia bahwa Allah menumbuhkan tanaman zaitun dan delima memiliki perawakan tanaman yang mirip daunnya tetapi bentuk buahnya berbeda. Dari kedua tafsir tersebut sesungguhnya terdapat petunjuk dari Allah sekaligus perintah kepada umat manusia agar senantiasa memperhatikan dan mencari tahu lebih lanjut terhadap tumbuhan yang Allah ciptakan agar sampai kepada kita manfaatnya serta dapat menambah rasa syukur atas nikmat karunia Allah SWT. Salah satu bentuk untuk mengetahui apakah tanaman itu serupa atau tidak ialah dengan menganalisis hubungan kekerabatan baik secara morfologi, anatomi, maupun molekuler.

## BAB V

### PENUTUP

#### 5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diperoleh dari penelitian ini adalah :

1. Berdasarkan hasil variasi sekuen gen *rbcL* *S. oleosa* terdapat 9 variasi dengan jenis *singleton* dan *parsimony informative*. Polimorfisme yang terletak pada 10 basa terakhir (*range base pairs* 580-590) sekuen gen *rbcL* merupakan lokasi SNP pada spesies *S. oleosa*. Variasi yang terdapat pada sekuen gen *rbcL* (580-590bp) tidak dipengaruhi oleh lingkungan, dikarenakan gen *rbcL* bersifat *conserve* sehingga tidak mudah mengalami perubahan/mutasi spontan.
2. Berdasarkan hasil rekonstruksi pohon filogenetik *S. oleosa* di Malang Raya terdapat 6 sampel yang memiliki hubungan kekerabatan tinggi. Diduga sampel (BL dan TR) berasal dari indukan yang sama begitu pula dengan sampel (TD, GL, VT dan SK). Dugaan indukan yang sama tersebut dikarenakan bibit sampel *S. oleosa* berasal dari tempat yang sama.

#### 5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan penulis pada penelitian ini adalah; Sebaiknya dilakukan eksplorasi lebih lanjut terkait tanaman *S. oleosa* di Malang raya agar sampel yang diuji lebih beragam dan informasi yang didapatkan juga semakin banyak. Peneliti dalam menganalisis hubungan kekerabatan spesies *S. oleosa* dapat menggunakan marka lain dari cpDNA sebagai marka kombinasi. Marka kombinasi tersebut seperti marka gen *matK-rbcL* dan *atpB-rbcL* sehingga dapat diketahui marka mana yang lebih efektif dalam analisis hubungan kekerabatan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adeyemi, T. O. & Ogundipe, O. T. 2012. Preliminary studies on isolation of genomic DNA suitable for PCR from some African Sapindaceae. *Biotechnology*. 11(3):172–177.
- Aulia, W., Kusnopranto, H., & Utomo, S.Y. 2019. Optimasi kecukupan ruang terbuka hijau melalui perhitungan potensi rosot karbon (suatu studi di pltu xyz). *Indonesian Journal of Environmental Education and Management*. 4(2).
- Al-Qarni Aidh. 2007. *Tafsir Muyassar*. Qisthi Press. Jakarta.
- Al-Qur'an dan terjemahan*. 2017. Kementrian Agama Republik Indonesia.
- Basith, A. 2012. Peluang gen *rbcL* sebagai dna barcode berbasis dna kloroplas untuk mengungkap keanekaragaman genetik padi beras hitam (*Oryza sativa* L.) *Peluang DNA Barcode Berbasis DNA Kloroplas untuk Mengungkap Keanekaragaman*. 938–941.
- Blume, L., Nio, S. A., Kolondam, B. J., & Tallei, T. E. 2018. *Evaluation of matK and rbcL Genes as Markers in*. 3.
- Brog, J.P., Chanez, C.L., Crochet, A., & Fromm, K.M. 2013. Polymorphism, what it is and how to identify it: a systematic review. *The Royal Society of Chemistry*.
- Chen, Y., Wang, B., Chen, J., Wang, X., Wang, R., Peng, S., & Luo, J. 2015. Identification of rubisco *rbcL* and *rbcS* in *Camellia oleifera* and their potential as molecular markers for selection of high tea oil cultivars. *Front Plant Sci*. 6:1–11.
- Chetia, P., Phukan, B. C., & Tamang, D. 2016. *RbcL* gene based molecular phylogenetic studies of certain *pteridophytes* of Assam. *Research & Reviews: A Journal of Bioinformatics*. 3(1):18–21.
- Cohen, I., Sapir, Y., & Shapira, M. 2006. Large subunit in different photosynthetic organisms. *Plant Physiol*. 141:1089–1097.
- Consortium Barcode of Life (CBOL). 2009. A dna barcode for land plants. *PNAS*. 106(31).
- Dahlan, Abd. Rahman. 2007. *Ensiklopedia al-Qur'an*. Lentera Hati. Jakarta.
- Daniell, H., Lin, C.H., Yu, M. & Chang, W.J. 2016. Chloroplast genomes: diversity, evolution, and applications in genetic engineering. *Genome Biol*. 17:134.
- Desjardins, P., & Conklin, D. 2010. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Jove-J Vis Exp*. 4(5): 1–4.
- Dharmayanti, N. I. 2011. Filogenetika molekular : metode taksonomi organisme berdasarkan sejarah evolusi. *Filogenetika Molekular : Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi*. 30:1–10.
- Dutoit, L., Burri, R., Nater, A., Mugal, C. F., & Ellegren, H. 2017. Genomic distribution and estimation of nucleotide diversity in natural populations: perspectives from the collared flycatcher (*Ficedula albicollis*) genome. *Mol Ecol Resour*. 17(4):586–597.
- Ellegren, H., & Galtier, N. 2016. Determinants of genetic diversity. *Nat Rev Genet*. 17(7):422–433.
- Felsenstein, J. 1978. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Syst Zool*. 27(4):401 – 410.

- Gaffar, S., & Sumarlin. 2020. Analisis sekuen mtdna coi pari totol biru yang didaratkan di tempat pendaratan ikan Kota Tarakan. *Jurnal Harpodon Borneo*. 13(2).
- Hall, B.G. 2001. *Phylogenetic Trees Made Easy: A How - To Manual for Molecular Biologists*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland. Massachusetts, USA.
- Hardiarto, T., Listanto, E., & Riyanti, E.I. 2015. Identifikasi cdna gen rb pada tanaman kentang produk rekayasa genetika katahdin sp951. *Jurnal AgroBiogen*. 11(2):59–64.
- Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia*. Jilid III. Badan Litbang Kehutanan.
- Hidayat, T. & Pancoro, A. 2008. Kajian filogenetika molekuler dan peranannya dalam menyediakan informasi dasar untuk meningkatkan kualitas sumber genetik anggrek. *Jurnal AgroBiogen*. 4(1):35-40.
- Hilu, K.W. & Liang, H. 1997. The matk gene: sequence variation and application in plant systematics. *Am J Bot*. 84(6): 830–839.
- Herrmann, F., & Wink, M. 2014. *Use of rbcL sequences for DNA barcoding and authentication of plant drugs used in Traditional Chinese Medicine*. 1.
- Ibnu Katsir Al-Qurosy al-Dimasyqi, Imaduddin Abilfidaa' Ismail Ibnu Amer, Al Bidayah Wan Nihayah. 1997. Jilid.1, Jizah. Hajar.
- Inkiriwang, M., Repi, R.A., & Nanlohy, F.N. 2017. Analisis filogeni molekuler tanaman pala (*Myristica* sp) dari tahuna menggunakan gen rbcL DNA kloroplas. *Jurnal Sains, Matematika, & Edukasi*. 5(2).
- Ismail, M., Ahmad, A., Nadeem, M., Javed, M.A., Khan, S.H., Khawaish, I., Sthanadar, A.A., Qari S.H., Alghanem, S.M., Khan, K.A., Khan, M.F., & Qamer, S. 2020. Development of DNA barcodes for selected *Acacia* species by using *rbcL* and *matK* DNA markers. *Saudi J Biol Sci*. 27(12):3735-3742.
- Jeon, H.K. & Eom, K.S. 2019. Mitochondrial dna sequence variability of *spirometra* species in asian countries. *Korean J Parasitol* 57(5): 481-487.
- Kellogg, E.A., & Juliano, N.D. 1997. The structure and function of rubisco and their implications for systematic studies. *Am J Bot*. 84(3):413–428.
- Kemena, C., & Notredame, C. 2009. Upcoming challenges for multiple sequence alignment methods in the highthroughputera. *Bioinformatics*. 25:2455– 2465.
- Lestari, D.A., Azrianingsih, R., & Hendrian. 2018. Filogenetik jenis-jenis annonaceae dari jawa timur koleksi kebun raya purwodadi berdasarkan coding dan non-coding sekuen dna. *J. Trop. Biodiv. Biotech*. 3:1—7.
- Li, J.F. 2015. A fast neighbor joining. *Genet. Mol. Res*. 14(3):8733-8743.
- Lin, T., Lin, Y., & Ishiki, K. 2005. Genetic diversity of *Dimocarpus longan* in China revealed by AFLP markers and partial *rbcL* gene sequences. *Sci Hortic-Amsterdam*. 103(4):489–498.
- Lundqvist, A., Andersson, Stefan, & Lonn, M. 2008. Genetic variation in wild plants and animals in Sweden. 1(1).
- Maloukh, L., Kumarappan, A., Jarrar, M., Salehi, J., El-wakil, H., & Rajya Lakshmi, T. V. 2017. Discriminatory power of *rbcL* barcode locus for authentication of some of United Arab Emirates (UAE) native plants. *Biotech*. 7(2):1–7.
- Meshram, N., M. Ojha, A. Singh, A. Alexander, and M. Sharma. 2015. Significance and traditional medicinal properties of *Schleichera oleosa*. *Asian J Pharm Res*. 5(1):61-64.

- Mordvintseva-Palamar, G. M., Tsarenko, P. M., & Barinova, S. 2015. Phylogenesis, Origin and Kinship of the Charophytic Algae. *Botanica Pacifica*. 10.
- Morrison, D.A. 2015. Is sequence alignment an art or a science? *Syst Bot.* 40(1):14–26.
- Mount, D.W. 2001. *Phylogenetic prediction*. In: *Bioinformatic, Sequence and Genome Analysis*. New York Press. New York.
- Moura, C. C. de M., Brambach, F., Bado, K. J. H., Krutovsky, K. V., Kreft, H., Tjitrosoedirdjo, S. S., & Gailing, O. 2019. Integrating DNA barcoding and traditional taxonomy for the identification of dipterocarps in remnant lowland forests of sumatra. *Plants*. 8(11).
- NCBI. 2019. *Schleichera oleosa* Merr. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY724367.1>
- Nurhasanah, S., & Papuangan, N. 2019. Amplification and Analysis of Rbcl Gene (Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase) of Clove in Ternate Island. *IOP Conference Series: Earth Env Sci T R So*. 276(1):0–7.
- Opie, C., Shultz, S., Atkinson, Q. D., Currie, T., & Mace, R. 2014. Phylogenetic reconstruction of Bantu kinship challenges Main Sequence Theory of human social evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111(49).
- Pangestika, Y., Budiharjo, A., & Kusumaningrum, H.P. 2015. Analisis filogenetik *Curcuma zedoaria* (temu putih) berdasarkan gen internal transcribed spacer (ITS). *Jurnal Biologi*. 4(4):8-14.
- Pertamawati. 2010. Pengaruh fotosintesis terhadap pertumbuhan tanaman kentang (*Solanum tuberosum* L.) dalam lingkungan fotoautotrof secara invitro. *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia*. 12(1):31-37.
- Pourmohammad, A. 2014. Application of molecular markers in medicinal plant studies. *Acta Universitatis Sapientiae, Agriculture and Environment*. 5(1):80–90.
- Rafidah, N., Fitmawati, F., Juliantari, E., & Sofiyanti, N. 2019. Variasi infraspecies macang (*Mangifera foetida*) berdasarkan sekuen gen rbcl. *Al-Kauniyah: Jurnal Biologi*. 12(1):1–7.
- Rozas, J., Mata, A.F., DelBarrio-Sanchez, J.C., Rico, S.G., Librado, P., Onsins-Ramos, S.E. & Gracia, A.S. 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Mol. Biol. Evol.* 34(12):3299–3302.
- Saitou, N. & M. Mei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for constructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406–425.
- Saitou, N. & T. Imanishi. 1989. Relative efficiencies of the Fitch-Margoliash, Maximum-Parsimony, Maximum Likelihood, Minimum Evolution and Neighbor-joining Methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. *Mol. Biol. Evol.* 6(5):514–525.
- Sharwood, R. E. 2017. Engineering chloroplasts to improve Rubisco catalysis: prospects for translating improvements into food and fiber crops. *New Phytol* 213(2):494–510.
- Shihab, M. Quraish. 2002. *Membumikan al-Qur'an: Fungsi dan Peran Wahyu dalam Kehidupan Masyarakat*. Cet. I,II. Mizan. Bandung.

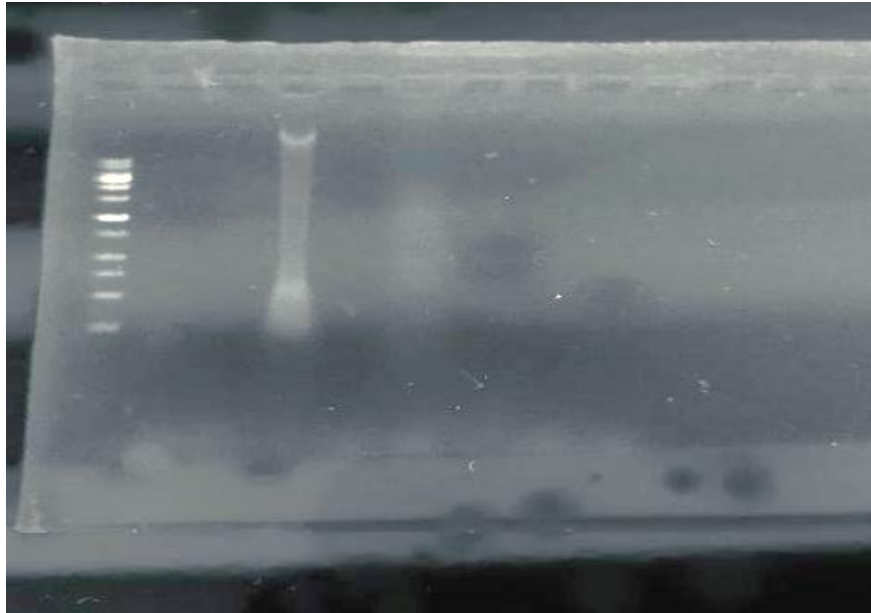
- Siahan, F.A. 2017. Pengaruh kondisi dan periode simpan terhadap perkecambahan benih kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr). *Jurnal Perbenihan Tanaman Hutan*. 5(1):1-11.
- Singh P., Mishra A., Singh P., Goswami S., Singh A., & Tiwari K.D. 2015. Hypertension and herbal plant for its treatment : a review. *Indian J Res Pharm Biotechnol*. 3(5):358–66.
- Singh, R. S., & Kulathinal, R. J. 2013. Polymorphism. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. 5(2):398–399.
- Subositi, D. & Widodo, H. 2010. Hubungan kekerabatan filogenetik interspesifik anggota genus stevia berdasarkan gen maturase k (matk). *The Journal of Indonesian Medicinal Plant*. 1(3).
- Suita, E. 2012. *Seri Teknologi Perbenihan Tanaman Hutan : Kesambi (Scheichera oleosa MERR.)*. Balai Penelitian Teknologi Perbenihan Tanaman Hutan. Bogor.
- Sukoco, R.M., Amin, M., & Gofur, A. 2016. Pengembangan buku ajar tabm berbasis penelitian untuk mahasiswa s1 jurusan biologi universitas negeri gorontalo. *Jurnal Pendidikan: Teori, Penelitian, dan Pengembangan*. 1(6):1098-1103.
- Sunaryo, W. 2015. Aplikasi dna barcoding untuk analisis keragaman genetik laidurian (*Durio zibethinus x kutejensis*) asal Kalimantan Timur. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon*. 1(6):1273-1277.
- Syafei, E.S. 1994. *Pengantar Ekologi Tumbuhan*. Jurusan Biologi FMIPA ITB. Bandung.
- Tafsir Al-Mukhtashar / Markaz Tafsir Riyadh, di bawah pengawasan Syaikh Dr. Shalih bin Abdullah bin Humaid (Imam Masjidil Haram) Referensi: <https://tafsirweb.com/2511-quran-surat-al-araf-ayat-57.html>
- Tallei, T.E., Rembet, R.E., Pelealu, J.J., & Kolondam, B.J. 2016. Sequence variation and phylogenetic analysis of sansevieria trifasciata (*asparagaceae*). *Bioscience Research*. 13(1):01-07.
- Warmadewi, D.A. 2017. *Buku Ajar: Mutasi Genetik*. Fakultas Peternakan Universitas Udayana. Denpasar.
- Wattoo, I. J., Zafar Saleem, M., Saqib Shahzad, M., Arif, A., Hameed, A., & Ahmad Saleem, M. 2016. DNA Barcoding: Amplification and sequence analysis of rbcL and matK genome regions in three divergent plant species. *Advancements in Life Sciences*. 4(1):3–7.
- Yang, H.C., Wu, K.C., Chuang, L.Y., & Chang, H.W. 2018. Decision tree algorithm generated single nucleotide polymorphism barcodes of rbcL genes for 38 *brassicaceae* species tagging. *Evol Bioinform*. 14:1–9.
- Yuliani, Y., Yuniaty, A., & Susanto, A. H. 2017. Variasi sekuens DNA yang diamplifikasi menggunakan primer atpb-rbcL pada beberapa kultivar kacang tanah. *Scripta Biologica*. 4(1):11.
- Yulita, K.S. 2007. Mutasi structural intron trnI (uaa) pada suku meranti-merantian (*dipterocarpaceae*). *Berita Biologi*. 8(6).
- Yustinadewi, P.D., Yustiantara, P.S. & Narayani, I. 2018. Teknik perancangan primer untuk sekuen gen mdr-1 varian 1199 pada sampel buffy coat pasien anak dengan Ila. *Jurnal Metamorfosa* 5(1): 105-111.
- Zakaria, B., Darmawan., Kasim, N., & Saepuddin, J. 2004. Peningkatan co2 internal tanaman kapas dengan pemberian metanol guna menaikkan produksi.

*Risalah Seminar Ilmiah Penelitian dan Pengembangan Aplikasi Isotop dan Radiasi.*

- Zhao, B., Li, J., Yuan, R., & Mao, S. 2017. Adaptive evolution of the *rbcL* gene in the genus *Rheum* (Polygonaceae). *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 31(3):493–498.
- Zuhaida, A., & Kurniawan, W. 2018. Deskripsi saintifik pengaruh tanah pada pertumbuhan tanaman: studi terhadap qs. al a'raf ayat 58. *Jurnal Thabiea*. 1(2):61–69.

## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Visualisasi Uji Kualitatif Genomik Sampel

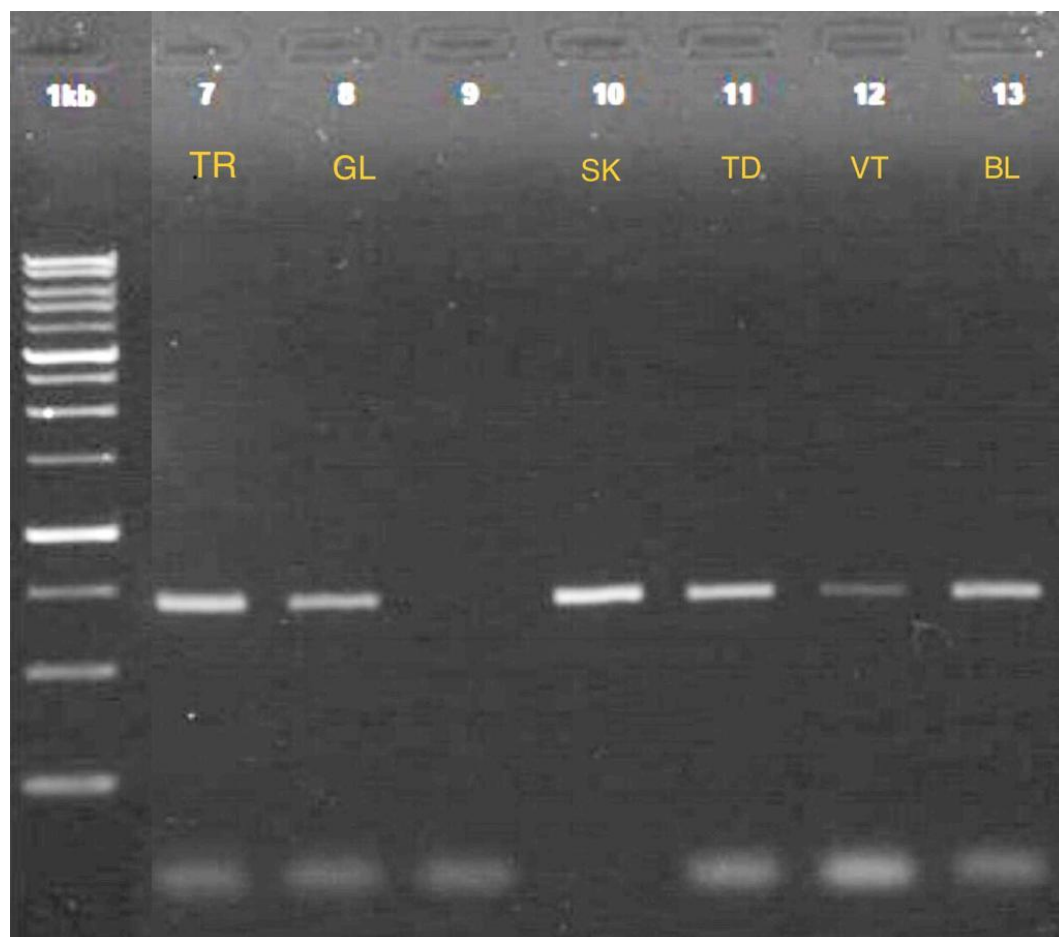


### Lampiran 2. Hasil Uji Kuantitatif Sampel (NanoDrop)

NAMA SAMPEL	260/280	Con (ng/ul)
SK	1.05	254.51
TD	1.00	206.65
GL	0.91	130.50
BL	2.00	349.69
TR	1.04	1001.5
VT	1,72	870.9



**Lampiran 3.** Visualisasi amplifikasi gen *rbcL* *S. oleosa* (590bp)



#### Lampiran 4. Hasil sekuen gen *rbcL* sampel *S. oleosa* menggunakan aplikasi SeqScanner

Nilai QV+20 ditunjukkan dengan batang di atas tiap simbol basa, batang biru menunjukkan QV+20 >20 dengan nilai keakuratan hasil sekuensing lebih dari 99%

##### Sampel A1 (TR)

```

1  CTAATGAGTT GTAGGGAGGG ACTTATGTCA CCACAAACAG AGACTAAAGC AAGTGTGGGA TTCAAAGCCG GTGTTAAAGA TTATAAATG ACTTATTATA CTCCTGACTA TGTAAACAAA
121 GATACTGATA TCTTGGCAGC ATTCCGAGTA ACTCCTCAAC CCGGGGTTCG GCCCGAGGAA GCAGGGGCGG CGGTAGCTGC GGAATCTTCT ACTGGTACAT GGCAACTGT GTGGACCGAT
241 GGGCTTACCA GTCTTGATCG TTACAAAGGA CGATGCTACA ACATTGAGCC TGTGTCTGGA GAAGAAAATC AATATATATG TTATGTAGCT TACCCCTTAG ACCCTTTTGA AGAAGGTTCT
361 GTTACTAACA TGTTTACTTC CATTGTGGGG AATGTATTGG GGTTTAAAGC CTGCGCGGCT CTACGTCTAG AGGATCTACG AGTCCCTCCC GCGTATTGGA AAACCTTCCA AGGCCCCCCA
481 CACGGCATCC AAGTTGAGAG AGATAAATG AACAGTATG GACGTCCCTT ATTGGGATGT ACTATTAAAC CTAAATTGGG ATTATCTGCT AAGAACTACG GGTAGATAAA

```

##### Sampel A2 (GL)

```

1  CTAATGAGTT GTAGGGAGGG ACTTATGTCA CCACAAACAG AGACTAAAGC AAGTGTGGGA TTCAAAGCCG GTGTTAAAGA TTATAAATG ACTTATTATA CTCCTGACTA TGTAAACAAA
121 GATACTGATA TCTTGGCAGC ATTCCGAGTA ACTCCTCAAC CCGGGGTTCG GCCCGAGGAA GCAGGGGCGG CGGTAGCTGC GGAATCTTCT ACTGGTACAT GGCAACTGT GTGGACCGAT
241 GGGCTTACCA GTCTTGATCG TTACAAAGGA CGATGCTACA ACATTGAGCC TGTGTCTGGA GAAGAAAATC AATATATATG TTATGTAGCT TACCCCTTAG ACCCTTTTGA AGAAGGTTCT
361 GTTACTAACA TGTTTACTTC CATTGTGGGG AATGTATTGG GGTTTAAAGC CTGCGCGGCT CTACGTCTAG AGGATCTACG AGTCCCTCCC GCGTATTGGA AAACCTTCCA AGGCCCCCCA
481 CACGGCATCC AAGTTGAGAG AGATAAATG AACAGTATG GACGTCCCTT ATTGGGATGT ACTATTAAAC CTAAATTGGG ATTATCTGCT AAGAACTACG GGTAGATAAA

```

##### Sampel A4 (SK)

```

1  CTAATGAGTT GTAGGGAGGG ACTTATGTCA CCACAAACAG AGACTAAAGC AAGTGTGGGA TTCAAAGCCG GTGTTAAAGA TTATAAATG ACTTATTATA CTCCTGACTA TGTAAACAAA 120
121 GATACTGATA TCTTGGCAGC ATTCCGAGTA ACTCCTCAAC CCGGGGTTCG GCCCGAGGAA GCAGGGGCGG CGGTAGCTGC GGAATCTTCT ACTGGTACAT GGCAACTGT GTGGACCGAT 240
241 GGGCTTACCA GTCTTGATCG TTACAAAGGA CGATGCTACA ACATTGAGCC TGTGTCTGGA GAAGAAAATC AATATATATG TTATGTAGCT TACCCCTTAG ACCCTTTTGA AGAAGGTTCT 360
361 GTTACTAACA TGTTTACTTC CATTGTGGGG AATGTATTGG GGTTTAAAGC CTGCGCGGCT CTACGTCTAG AGGATCTACG AGTCCCTCCC GCGTATTGGA AAACCTTCCA AGGCCCCCCA 480
481 CACGGCATCC AAGTTGAGAG AGATAAATG AACAGTATG GACGTCCCTT ATTGGGATGT ACTATTAAAC CTAAATTGGG ATTATCTGCT AAGAACTACG GGTAGATAAA 591

```

##### Sampel A5 (TD)

```

1  TCTAATGAGT TGTAGGGAGG GACTTATGTC ACCACAACCA GAGACTAAAG CAAGTGTGGG ATTCAAAGCC GGTGTTAAAG ATTATAAAT GACTTATTAT ACTCCTGACT ATGTAACAAA 120
121 AGTACTGATG ATCTTGGCAGC CATTCCGAGT AACTCCTCAAC CCGGGGTTCG GCCCGAGGAA AGCAGGGGCGG CGGTAGCTGC GGAATCTTCT TACTGGTACAT TGGCAACTGT TGTGGACCGA 240
241 TGGGCTTACG AGTCTTGATC GTTACAAAGG ACGATGCTACA AACATTGAGC CTGTGTCTGG AGAAGAAAATC CAATATATAT GTTATGTAGC TTACCCCTTAG GACCTTTTGA AGAAGGTTCT 360
361 TGTTACTAAC ATGTTTACTT CCAATTGTGGG GAATGTATTG GGTTTAAAGC CTTGCGCGGCT TCTACGTCTA GAGGATCTAC GAGTCCCTCC CCGGTATTGG AAACTTTTCA AGGCCCCCCA 480
481 ACACGGCATC CAAGTTGAGG AGATAAATG GAACAGTATG GACGTCCCTT TATTGGGATG TACTATTAAA CCTAAATTGG GATTATCTGC TAAGAACTAC CCGGTAGATA AA 592

```

##### Sampel A6 (VT)

```

1  CTAATGAGTT GTAGGGAGGG ACTTATGTCA CCACAAACAG AGACTAAAGC AAGTGTGGGA TTCAAAGCCG GTGTTAAAGA TTATAAATG ACTTATTATA CTCCTGACTA TGTAAACAAA 120
121 GATACTGATA TCTTGGCAGC ATTCCGAGTA ACTCCTCAAC CCGGGGTTCG GCCCGAGGAA GCAGGGGCGG CGGTAGCTGC GGAATCTTCT ACTGGTACAT GGCAACTGT GTGGACCGAT 240
241 GGGCTTACCA GTCTTGATCG TTACAAAGGA CGATGCTACA ACATTGAGCC TGTGTCTGGA GAAGAAAATC AATATATATG TTATGTAGCT TACCCCTTAG ACCCTTTTGA AGAAGGTTCT 360
361 GTTACTAACA TGTTTACTTC CATTGTGGGG AATGTATTGG GGTTTAAAGC CTGCGCGGCT CTACGTCTAG AGGATCTACG AGTCCCTCCC GCGTATTGGA AAACCTTCCA AGGCCCCCCA 480
481 CACGGCATCC AAGTTGAGAG AGATAAATG AACAGTATG GACGTCCCTT ATTGGGATGT ACTATTAAAC CTAAATTGGG ATTATCTGCT AAGAACTACG GGTAGATAAA 590

```

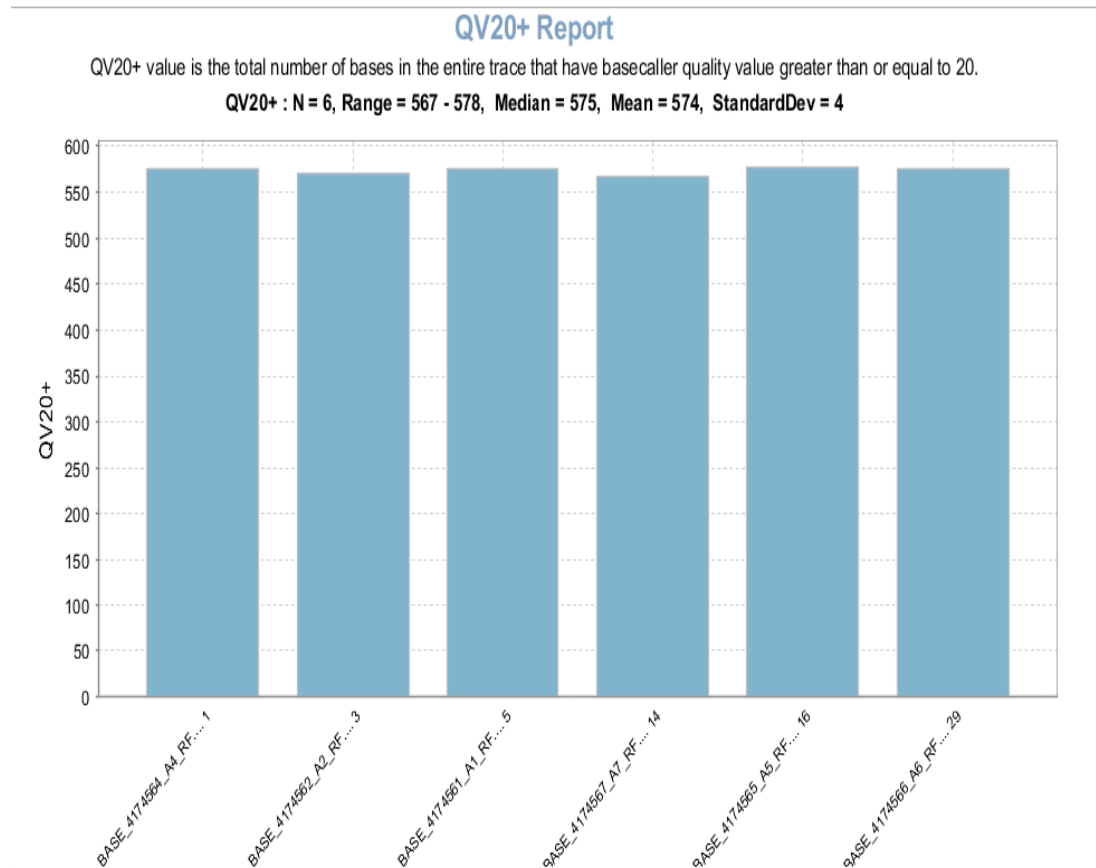
##### Sampel A7 (BL)

```

1  CTAATGAGTT GTAGGGAGGG ACTTATGTCA CCACAAACAG AGACTAAAGC AAGTGTGGGA TTCAAAGCCG GTGTTAAAGA TTATAAATG ACTTATTATA CTCCTGACTA TGTAAACAAA 120
121 GATACTGATA TCTTGGCAGC ATTCCGAGTA ACTCCTCAAC CCGGGGTTCG GCCCGAGGAA GCAGGGGCGG CGGTAGCTGC GGAATCTTCT ACTGGTACAT GGCAACTGT GTGGACCGAT 240
241 GGGCTTACCA GTCTTGATCG TTACAAAGGA CGATGCTACA ACATTGAGCC TGTGTCTGGA GAAGAAAATC AATATATATG TTATGTAGCT TACCCCTTAG ACCCTTTTGA AGAAGGTTCT 360
361 GTTACTAACA TGTTTACTTC CATTGTGGGG AATGTATTGG GGTTTAAAGC CTGCGCGGCT CTACGTCTAG AGGATCTACG AGTCCCTCCC GCGTATTGGA AAACCTTCCA AGGCCCCCCA 480
481 CACGGCATCC AAGTTGAGAG AGATAAATG AACAGTATG GACGTCCCTT ATTGGGATGT ACTATTAAAC CTAAATTGGG ATTATCTGCT AAGAACTACG GGTAGATAAA 591

```

**Lampiran 5.** Diagram analisis QV 20+ sekuen gen rbcL sampel *S. oleosa*  
menggunakan aplikasi SeqScanner





KEMENTERIAN AGAMA  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
JURUSAN BIOLOGI

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp (0341) 558933, Fax. (0341) 558933

**KARTU KONSULTASI SKRIPSI**

Nama : Fathimah Cahya Raudha  
NIM : 16620085  
Program Studi : S1 Biologi  
Semester : Genap TA 2019/2020  
Pembimbing : Azizatur Rahmah, M.Sc.  
Judul Skripsi : Analisis Hubungan Kekerbatan Kesambi (*Schleichera oleosa* Merr.) di Malang Raya Berdasarkan Sekuen Marka Molekuler gen *rbcL* (large subunit ribulose 1,5 biphosphat carboxylase/oxygenase)

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1.	20 Februari 2020	Konsultasi Judul	
2.	13 Maret 2020	Konsultasi BAB I	
3.	11 April 2020	Revisi BAB I	
4.	22 Juni 2020	Konsultasi Bab II&III	
5.	5 Agustus 2020	Revisi BAB II & BAB III	
6.	7 Oktober 2020	Finalisasi BAB I,II,III	
7.	7 Mei 2021	Konsultasi BAB IV	
8.	19 Mei 2021	Revisi BAB IV	
9.	24 Mei 2021	Finalisasi BAB IV, ACC Skripsi	

Pembimbing Skripsi,

Azizatur Rahmah, M. Sc  
NIP. 198609302019032011



Malang, 24 Mei 2021  
Ketua Program Studi,

Dr. Evika Sandi Savitri, M.P.  
NIP. 19741018 200312 2 002



**KEMENTERIAN AGAMA  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK  
IBRAHIM MALANG  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
PROGRAM STUDI BIOLOGI**

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp (0341) 558933, Fax. (0341) 558933

**KARTU KONSULTASI SKRIPSI**

Nama : Fathimah Cahya Raudha  
NIM : 16620085  
Program Studi : S1 Biologi  
Semester : Genap TA 2020/2021  
Pembimbing : Dr. H.Ahmad Barizi, M.A  
Judul Skripsi : Analisis hubungan kekerabatan kosambi (*Schleichera oleosa* merr.) di Malang raya berdasarkan sekuen marka molekuler gen *rbcl* (large subunit ribulose 1,5 biphospat carboxylase/oxygenase)

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd.
1	10 Maret 2020	Integrasi BAB I	
2	12 Maret 2020	Integrasi BAB II	
3	13 Oktober 2020	ACC Integrasi Proposal	
4	7 Mei 2021	ACC Naskah Skripsi	
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			

Pembimbing Skripsi

Dr. H. Ahmad Barizi, M.A  
NIP. 197312121998031008

Malang, 2 Juni 2021  
Ketua Program Studi,

Dr. Evika Sandi Savitri, M.P  
NIP. 197410182003122002